

**BODO WEBER**

---

EVALUATION PROGNOTISCHER FAKTOREN DES  
DIFFUS GROßZELLIGEN B-ZELL LYMPHOMS NACH  
EINFÜHRUNG DER RITUXIMAB-IMMUNTHERAPIE

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*schön schreiben*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**EVALUATION PROGNOSTISCHER FAKTOREN DES  
DIFFUS GROSßZELLIGEN B-ZELL LYMPHOMS  
NACH EINFÜHRUNG DER RITUXIMAB- IMMUNTHERAPIE**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Bodo Weber**  
aus Trier

Gießen 2017

Aus der Medizinischen Klinik IV, Schwerpunkt Hämatologie

Unter Prof. Dr. Mathias Rummel

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. M. Rummel

Gutachter: Prof. Dr. S. Gattenlöhner

Tag der Disputation: 25.09.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Risikofaktoren/ Ätiologie	1
1.3 B- Zell Biologie und Lymphomgenese	2
1.4 Klassifikation und Stratifizierung	8
1.5 Klinik und Therapie des DLBCL	15
1.6 Überblick und Zielsetzung	17
<b>2. METHODIK</b>	<b>17</b>
2.1 Auswahlkriterien	17
2.2 Patientendaten und - Parameter	18
2.3 Immunhistochemische Nachanalyse	21
2.4 Statistische Auswertung	22
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
3.1 Patienten	23
3.2 Krankheitscharakteristika	24
3.3 Prognostik und Verlauf	28
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>47</b>
4.1 Epidemiologie	48
4.2 Therapie und Verlauf	50
4.3 Prognostik	54

<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>74</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>75</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

- 1.1 Rekurrente Aberrationen in ABC- und GCB- Lymphomen
- 1.2 Gesamtüberleben nach IPI- Risikokategorie in der Rituximab- Ära
- 2.1 Stratifizierung nach IPI- Risikofaktoren und –Gruppen
- 2.2 Immunhistochemische Stratifizierung nach Hans- Algorithmus
- 3.1 Distribution der IPI- Risikofaktoren auf Ann- Arbor Stadien
- 3.2 Distribution der Lymphome nach Hans- Algorithmus
- 3.3 Gesamtüberleben aller Patienten
- 3.4 Gesamtüberleben nach Therapieregime und –ansprechen
- 3.5 Distribution der IPI- Risikofaktoren
- 3.6 Verteilung der Patienten und Todesfälle auf r-IPI Risikogruppen
- 3.7 Gesamtüberleben nach Therapieregime und –ansprechen
- 3.8 Progressionsfreies Überleben in IPI- Gruppen
- 3.9 Gesamtüberleben nach IPI- Faktoren
- 3.10. Gesamtüberleben Niedrig- und Nicht- Niedrigrisiko IPI
- 3.11 Progressionsfreies Überleben nach CD10- Phänotyp
- 3.12 Kumulierte Häufigkeit von Todesfällen in GCB- und non-GCB Lymphomen
- 3.13 Gesamtüberleben nach Hans- Algorithmus
- 3.14 Progressionsfreies Überleben nach Hans- Algorithmus
- 3.15 Kumulierte Häufigkeit von Rezidiven in GCB- und non-GCB Lymphomen
- 3.16 Gesamtüberleben nach Hans- Algorithmus in Hochrisikopatienten
- 4.1 Distribution der IPI- Risikofaktoren auf Ann- Arbor Stadien
- 4.2 Gesamtüberleben nach LDH- Niveau

- 4.3 Gesamtüberleben verschiedener Altersgruppen
- 4.4 Gesamtüberleben nach bcl-6 Phänotyp mit/ ohne Rituximab
- 4.5 Gesamtüberleben nach Hans Algorithmus bei >3 IPI- Risikofaktoren
- 4.6 Progressionsfreies Überleben nach Hans- Algorithmus im Interstudien-Vergleich



## **TABELLENVERZEICHNIS**

- 1.1 WHO- Klassifikation großzelliger B-Zell- Lymphome
- 2.1 Klinische und laborchemische Parameter der Studie
- 2.2 Immunhistochemische Charakteristika
- 3.1 Patientencharakteristika
- 3.2 Subgruppenanalyse für klinische Risikofaktoren
- 3.3 Distribution der Patienten auf IPI- Risikogruppen und –Faktoren
- 3.4 Zusammenhangsgrad der IPI- Faktoren
- 3.5 Assoziation klinischer und immunhistochemischer Parameter
- 4.1 Vergleich von Gesamtüberleben und Patientendistribution nach IPI- Gruppen
- 4.2 Inzidenz der IPI- Faktoren



# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das Diffus großzellige B- Zelllymphom (DLBCL) ist mit einem Anteil von ca. 48% der Neuerkrankungen an Non- Hodgkin Lymphomen (NHL) das in Deutschland am häufigsten auftretende NHL (1). Die Inzidenz des DLBCL in Deutschland liegt bei geschätzten 8/100.000 Fällen unter Frauen, beziehungsweise 11/100.000 Fällen unter Männern pro Jahr. Das Geschlechtsverhältnis bei Neuerkrankungen beträgt demnach etwa 1,3:1 (m:w) (2). Die Häufung unter männlichen Patienten fügt sich in das Gesamtbild hämatologischer Erkrankungen, die im Allgemeinen eine männliche Prädominanz aufweisen. Die Tendenz mit der Neuerkrankungen auftreten ist zunehmend. So stieg die Inzidenz des DLBCL in Deutschland von schätzungsweise 8,3 Fällen/ 100.000 im Jahr 2007 auf 9,6/ 100.000 im Jahr 2012. Dieser Trend spiegelte sich auch in der Inzidenz der Gesamtzahl der NHL wieder. Bei Betrachtung der altersstandardisierten Inzidenz traten das DLBCL ebenso wie die Gesamt-NHL in den Jahren von 2009- 2012 allerdings mit gleichbleibender Häufigkeit auf. Die Häufigkeit der DLBCL- Neuerkrankungen steigt mit zunehmendem Lebensalter und gipfelt in einer Inzidenz von etwa 39/100.00 in der Gruppe der 80-84- Jährigen. Lediglich 1-2% der Fälle betreffen Patienten jünger als 20 Jahre (1). Der Altersmedian liegt bei etwa 70 Jahren (2).

## 1.2 Risikofaktoren/ Ätiologie

Als allgemeine Risikofaktoren für die Entstehung eines NHL wurden Immunsuppressionen, infektiöse Agenzien, Umwelt- und Lebensstilfaktoren sowie familiäre Vorbelastung identifiziert (3-5).

Eine gepoolte Analyse von 19 Fall-Kontroll- Studien konnte obengenannte allgemeine Risikofaktoren auch im Speziellen für das DLBCL bestätigen und ergänzen: Kontinuierliche Antigenexposition im Sinne einer anhaltenden Immunstimulation, wie zum Beispiel im Rahmen von B- Zell aktivierenden Autoimmunerkrankungen oder einer chronifizierten

Hepatitis C Infektion, begünstigen die Lymphom Genese. Weitere infektiöse Agenzien, die mit der Entstehung eines DLBCL in Verbindung gebracht werden, sind das EBV Virus unter älteren Patienten, HIV und *Borrelia burgdorferi* (4, 6). Ferner wurden ein erhöhter Body-Mass-Index im jungen Erwachsenenalter und eine positive Familienanamnese für NHL mit der Genesis eines DLBCL assoziiert. Ein erhöhter Sozioökonomischer Status und das Vorliegen einer Atopie zeigten hingegen eine inverse Assoziation zur Lymphomprävalenz. Raucher hatten ein erhöhtes Risiko für zerebrale, testikuläre oder kutane Lymphommanifestationen, Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung für gastrointestinale DLBCL. Offenbar zeigte sich bei Häufung mehrerer der genannten Risikofaktoren kein kumulativer Effekt auf das Gesamtrisiko ein Lymphom zu entwickeln (7, 8).

### 1.3 B- Zell Biologie und Lymphomgenese

Das DLBCL ist ein aggressives Lymphom mit diffus-infiltrativem Wachstumsmuster von reifen B-Zellen des doppelten Durchmessers normaler Lymphozyten (9). DLBCL entstehen primär als sogenannte de novo Lymphome oder entwickeln sich sekundär aus transformierten indolenten Lymphomen, insbesondere der chronisch lymphatischen Leukämie und des Follikulären Lymphoms (10).

Eine zentrale Schaltstelle im Evolutionsprozess reifer B- Zellen ist der B-Zell Rezeptor (BZR), auch bezeichnet als Immunglobulin. Eine ungünstige Affinitätskonstellation des BZR, das heißt eine zu hohe Affinität gegenüber körpereigenen oder eine zu geringe Affinität gegenüber fremden Antigenen, führt zur Apoptose der B- Zelle. Indessen übermittelt eine adäquate Erkennung körperfremder Antigene über den BZR ein Überlebenssignal an die B-Zelle (8).

Diese Selektionsprozesse finden in den Keimzentren von Lymphfollikeln statt: Während der sogenannten Keimzentrumsreaktion proliferieren an diesem Ort Zentroblasten in hoher Frequenz. Insbesondere in den helleren Zonen des Keimzentrums differenzieren sich Zentroblasten zu Zentrozyten um als antigenpräsentierende Zellen mit T- Zellen zu interagieren. Zentrozyten differenzieren sich nach Stimulation durch T- Zellen zu Plasmazellen oder B- Gedächtniszellen weiter, oder entwickeln sich zurück zu mitotisch aktiven Zentroblasten (11). Zwei Mechanismen sind für die Reifung und Adaption des BZR während jener Keimzentrumsreaktion wesentlich: der Klassenwechsel des Immunglobulins

von IgM zu IgG, -A oder -E sowie die Affinitätsanpassung des Rezeptors an ein bestimmtes Antigen durch somatische Hypermutation. Die hiermit einhergehenden DNA- Alterationen garantieren zugleich die Vielfalt des adaptiven Immunsystems, bieten aber auch eine Prädisposition zur Entstehung von Lymphomen (12).

Die Pathogenese des DLBCL ist komplex; schätzungsweise birgt jedes Lymphom dieser Gruppe im Durchschnitt zwischen 30 und 100 klonale genetische Aberrationen (13).

Häufigste onkogene Mechanismen sind Mutationen und Vermehrung der Gen-Kopienzahl, seltener auch Translokationen und Aberrationen (14).

Mithilfe von Genexpressionsprofilen lassen sich großzellige B- Zell Lymphome ferner in drei morphologisch nicht unterscheidbare Gruppen unterteilen: Keimzentrumlymphome (GCB), aktivierte B- Zellymphome (ABC) sowie primär mediastinale Lymphome (PMBL) (15-17).

Letztere zeigen Gemeinsamkeiten mit Hodgkin Lymphomen, wie zum Beispiel die mutmaßliche Herkunft aus Thymus B-Zellen und werden aufgrund ihrer, im Vergleich zu den GCB- und ABC- Lymphomen, sehr distinkten Biologie und Klinik als eigene Lymphomentität eingestuft (18).

### **1.3.1 Charakteristische onkogenetische Aberrationen des GCB- Subtyps**

Das physiologische Pendant zum GCB- Subtyp des DLBCL ist der Zentroblast in den Keimzentren der Lymphfollikel (15, 16). Eine der rekurrierenden Aberrationen des GCB- Phänotyps ist eine Deletion im *phosphatase and tension homolog* PTEN Gen. PTEN ist in seiner physiologischen Funktion ein Tumorsuppressor, der die Zellproliferation unterbindet. Fehlende Expression des Enzyms resultiert über den PI3K- Signalweg in einer gesteigerten Proliferation und der Inhibition der Zellapoptose (19, 20).

Das bcl-2 Protein übt eine antiapoptotische Funktion auf die B- Zelle aus und verlängert deren Überlebensspanne. Die Translokation t(14;18) stellt die Expression des bcl-2 Gens unter die Kontrolle eines Immunglobulin Translokationspartners. Diese, für das Follikuläre Lymphom charakteristische Translokation, ist in jener Entität vermutlich Startpunkt der Lymphom Genese (21). In de novo DLBCL tritt die t(14;18) in etwa 20-30% der Fälle auf, bleibt aber im Wesentlichen auf den GCB- Phänotyp beschränkt (22).

Als weitere rekurrierende Aberration des GCB- Subtyps wurde die MDM2- Amplifikation beschrieben. MDM2 unterdrückt die Funktion des p53 Tumorsuppressor Proteins und

begünstigt so indirekt das Zellüberleben und die Akkumulation genomischer Aberrationen. MDM2 Überexpression wird in Verbindung mit der Lymphomentstehung gebracht (19, 23). Ferner zeigten Bedekovics et al. dass die Überexpression der Ubiquitin Hydrolase 1 UCH- L1 stark mit dem GCB- Subtyp korreliert. UCH- L1 hat onkogene Effekte auf die Zellbiologie und trägt zur Lymphomentstehung bei. UCH- L1 positive GCB- Lymphome rezidierten signifikant früher als ihre UCH- L1 negativen Pendanten (24).

### **1.3.2 Charakteristische onkogenetische Aberrationen des ABC- Subtyps**

Ausgangszelle dieses Phänotyps ist, abgeleitet aus dem Charakter der exprimierten Gene, der NFκB- Aktivierung und des naiven IgM- B- Zellrezeptors vermutlich die prä- GCB B-Zelle oder der Plasmablast (12, 25). Die onkogene Zellbiologie des ABC- Subtyps zeichnet sich durch kontinuierliche Aktivierung des NFκB- Signalwegs aus. Diese Signalkaskade beeinflusst Zellteilung, -Differenzierung und Immunkompetenz und bahnt die Differenzierung der aktivierten B- Zelle zum Plasmablast (26). Tonische NFκB- Signalwirkung über den BZR hat antiapoptotische Effekte auf die Biologie der Lymphomzelle. ABC- aber nicht GCB- Zellen sind in ihrem Überleben abhängig von einer kontinuierlichen Aktivierung der BZR- NFκB- Signalachse (12, 27).

Weiterhin ist die Expression des Forkhead box P1 (FOXP1) Proteins stark mit dem ABC- Subtyp assoziiert. FOXP1 supprimiert typische Effektoren des Keimzentrumsprogramms in GCB- Zellen, insbesondere bcl-6 und fördert die Differenzierung zum Plasmablast über den NFκB- Weg. FOXP1 hat über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren antiapoptotischer Gene und seinen Antagonismus des p53- Tumorsuppressorproteins einen antiapoptotischen Einfluss. Seine Expression korreliert daher mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf und einer extranodalen Manifestation des Lymphoms (19, 25, 28).

Deletion des INK4 Gens resultiert in der Unterexpression der Cyclin D Kinase CDKN2A und bleibt unter DLBCL auf den ABC- Subtyp beschränkt. CDKN2A koordiniert die Signalwege zweier Tumorsuppressorproteine und stabilisiert p53. Dadurch wird das Voranschreiten des Zellzyklus über die G1/2 Phase verhindert. Unterexpressionen dieser Cyclin D Kinase gehen mit einer ungünstigen Prognose einher (29).

Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID)- Enzyme induzieren Doppelstrang- DNA Brüche und werden in B- Lymphozyten zum Klassenwechsel und zur Affinitätsreifung des BZR herangezogen. Trotz des in ABC- Lymphomen häufig naiven IgM- Klasse BZR exprimieren diese Lymphome AID- Enzyme auf auffällig hohem Niveau. Diese im

Hintergrund ablaufenden, unphysiologischen und aberranten Klassenwechsel und Hypermutationen tragen vermutlich zur Mutagenese und zur Entstehung von Translokationen, insbesondere der bcl-6 und c-Myc Translokationen in diesem Phänotyp bei (30).

### **1.3.3 Gemeinsame onkogenetische Läsionen beider Phänotypen**

Obwohl GCB- und ABC Lymphome ihren Ausgang von unterschiedlichen Stadien in der B-Zell Differenzierung nehmen, lassen sich pathogenetische Gemeinsamkeiten in beiden Subtypen finden: Myc ist ein Onkogen das die Zellbiologie über vielfältige Mechanismen beeinflusst. Das genaue Ausmaß seines onkogenen Potentials steht in Abhängigkeit von dem Mechanismus der Überexpression wie zum Beispiel Amplifikationen oder Translokationen und dem jeweiligen Translokationspartner. Myc Rearrangement bzw. Translokation (Myc-R) tritt häufig mit nicht- Ig- Genen auf und ist im Falle des DLBCL mit komplexen Veränderungen im Karyotyp assoziiert (19). Myc-R positive Lymphome stellen eine Untergruppe der DLBCL mit aggressivem Phänotyp und ungünstiger Prognose dar. Myc-R tritt in etwa 5-14% aller de novo DLBCL auf (31, 32). Die meisten dieser Myc-R Lymphome zeigen weitere rekurrende Translokationen wie bcl-2 oder bcl-6 sowie multiple Myc-Translokationen und unterscheiden sich hierin von Burkitt Lymphomen, deren Myc- R mit allenfalls geringen chromosomalen Aberrationen einhergeht (31). Lymphome mit mehr als einer rekurrenden Translokation werden in der neuen WHO- Klassifikation als eigenständige Entität unter den double- hit Lymphomen (DHL) zusammengefasst (33). Myc-R treten mit ähnlicher Häufigkeit in GCB und ABC Subtypen auf. Insgesamt konstituieren DHL schätzungsweise 5% aller DLBCL. Die Mehrzahl der DHL wird aufgrund des hier häufigeren bcl-2 Rearrangements den GCB- Lymphomen zugerechnet (31, 32, 34, 35). Einige Lymphome mit Myc- R exprimieren bcl-2 oder bcl-6 auch ohne Translokation übermäßig stark. Diese sogenannten „double- expressors“ (DE) (19) finden sich in etwa 20-30% der DLBCL und konstituieren, wenn auch in geringerem Ausmaß als DHL, eine prognostisch ungünstige Subgruppe (36). Der DE- Phänotyp tritt häufiger in ABC- Lymphomen auf, die bcl-2 auch ohne Translokationen übermäßig und vielfach stärker als GCB exprimieren können (15, 19).

Ferner wurde sowohl in ABC- als auch in GCB- Lymphomen eine kontinuierliche Aktivierung des B- Zell Rezeptors (BZR) nachgewiesen. GCB- Lymphome vollziehen meist

einen Klassenwechsel des BZR von IgM zu IgG. Die für diese Lymphome typische Deletion im PTEN- Gen führt über PI3K- Aktivierung zur tonischen Signalwirkung des BZR (19). ABC- Lymphome behalten hingegen in der Regel die naive IgM- Klasse des BZR. Vermutlich ist der ausbleibende Klassenwechsel essenziell für den Arrest dieser B-Zellen auf dem Weg zur Plasmazelldifferenzierung und garantiert über seine Signaltransduktion über die NFκB- Achse das Überleben der Tumorzelle. Die in diesen Zellen im Hintergrund ablaufenden frustranen und unphysiologischen Klassenwechsel tragen offenbar zur genomischen Instabilität des ABC- Subtyps bei (37). Trotz der tendenziell unterschiedlichen BZR- Klassen in beiden Isotypen, lässt sich aus dieser Information kein sicherer Rückschluss auf die Ursprungszelle ziehen (30, 37).

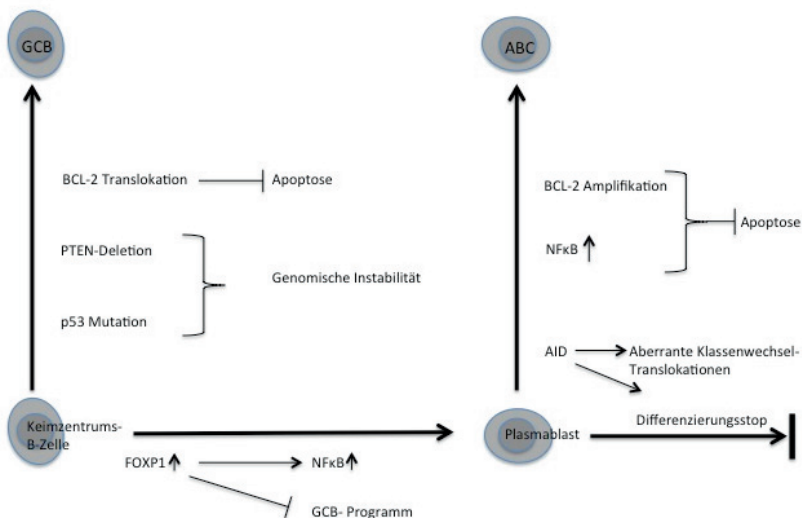
Challa- Malladi et al. beschrieben in einer Publikation gemeinsame Mechanismen denen sich Lymphome beider Subtypen bedienen um sich der Immunüberwachung zu entziehen: In mehr als 60% der DLBCL konnten fehlende oder aberrante Expression von β-2- Mikroglobulin oder CD58 nachgewiesen werden. β-2 MG – Inaktivierung verhindert die Expression von HLA- I Antigenen und somit die Erkennung durch zytotoxische T- Zellen. CD58 ist notwendig zur Adhäsion und Aktivierung zytotoxischer T- Zellen und NK- Zellen (38). Bcl-6 Translokationen oder Mutationen sind häufig unter DLBCL. Die Deregulierung von bcl-6 wird in Verbindung mit der Lymphom Genese gebracht (39). Translokationen des Gens treten häufiger in ABC-, Mutationen häufiger in GCB- Lymphomen auf. Bcl- 6 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Keimzentrumbildung. So liegt die bcl-6 Proteinexpression in GCB-Lymphomen auf einem deutlich höheren Niveau als in ABC- Lymphomen und korreliert mit einer günstigeren Prognose für das Gesamtüberleben (40).

Chen et al. untersuchten Auswirkungen der Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4. Überdurchschnittliche Expression auf der Zelloberfläche ging mit höheren Zellproliferationsraten einher. Obschon Überexpressionen in beiden Phänotypen auftreten, fanden Chen et al. eine signifikante Häufung und stärkere Expression für den ABC- Subtyp. In DLBCL ist die CXCR4- Überexpression prognostisch ungünstig im Hinblick auf Gesamt- und progressfreies Überleben. Bei separater Betrachtung zeigten CXCR4- positive Lymphome lediglich unter GCB ein signifikant kürzeres progressfreies Überleben, unter ABC Lymphomen indes lediglich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (41).



### 1.3.4 Mikromilieu

Lenz et al. veröffentlichten ein auf Gen- Expression basierendes Modell, das die Lymphome in Abhängigkeit ihres nicht- malignen zellulären Mikromilieus in zwei prognostisch unterschiedliche Gruppen unterteilt: den günstigeren Stroma- 1 und eher ungünstigen Stroma- 2 Typ. Die in ersterem Typ gefundenen Genexpressionsprofile lassen auf ein Stroma- Mikromilieu mit reichlich extrazellulärer Matrix und histiozytärer Infiltration schließen. Der zweite Stroma- Typ war von Neoangiogenese und einer hohen Blutgefäßdichte geprägt. Keines dieser Mikromilieus konnte eindeutig dem ABC- oder GCB- Typ zugeordnet werden (42). Diese Ergebnisse konnten auch mit immunhistochemischen Methoden bestätigt werden: SPARC ist eines der Gene aus der Stroma-1 Signatur. Meyer et al. präsentierten Daten, nach denen Lymphome mit SPARC+ Zellen im Mikromilieu als Surrogat des Stroma-1 Typs einen günstigeren Verlauf hatten (43). Cardesa- Salzmann et al. zeigten, dass die immunhistochemisch nachgewiesene Dichte der Blutgefäße im Lymphomstroma mit dem Stroma-2 Typ korreliert. Eine hohe Dichte CD31- positiver Zellen im Mikromilieu war mit einer schlechteren Prognose assoziiert (44).



**Abb. 1.1:** Charakteristische onkogene Aberrationen des GCB- und ABC- Subtyps. Nach: Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1417-29.

## 1.4 Klassifikation und Stratifizierung

Großzellige B-Zelllymphome sind eine sehr vielfältige Gruppe von Erkrankungen: Zum einen, wie bereits oben ausgeführt, im Hinblick auf die sehr unterschiedliche Biologie und Genetik, zum anderen aber auch unter klinischen Aspekten, mit einigen Patienten mit exzellenter Prognose und anderen, die sich bereits initial als therapierefraktär erweisen (45).

Zur Stratifizierung dieser heterogenen Patientengruppe wurden großzellige Lymphome analog sich wandelnder Klassifikationen unter verschiedenen Entitäten subsummiert. Die überarbeitete Kiel- Klassifikation von 1988 unterschied nach Immunphänotyp B- von T-Zell Lymphomen und unterteilte aggressive, großzellige Lymphome nach ihrer Morphologie in Immunoblastisch, Zentroblastisch und Anaplastisch (46). 1994 wurde die R.E.A.L.- Klassifikation etabliert mit dem Ziel Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der diagnostizierten Entitäten zu erhöhen. Diese Klassifikation berücksichtigt neben den zuvor etablierten immunhistochemischen und morphologischen nun auch molekulargenetische und klinische Aspekte zur Stratifizierung der Lymphome. Die in der Kiel- Klassifikation als zentroblastisch und -zytisch, sowie anaplastisch kategorisierten Lymphome werden nun unter den Diffus Großzelligen B- Zell Lymphome zusammengefasst. Das primär mediastinale Lymphom wird aufgrund seiner besonderen klinischen Stellung bereits als eigene Entität aufgelistet(47). Die in der Folge etablierten und auf der R.E.A.L. –Klassifikation basierenden WHO- Klassifikationen ergänzten ausgehend von klinischen und molekulargenetischen Erkenntnissen die Stratifikation durch weitere Entitäten.

Die Gruppe der DLBCL wird in zwei Kategorien unterteilt: I) Nach klinisch- anatomischer Konstellation; hierunter fallen unter anderem das primäre ZNS- Lymphom oder das primär-kutane LBCL. II) in die klinisch- anatomisch nicht weiter spezifizierbaren DLBCL- NOS. Davon abgrenzbar sind eigenständige Entitäten wie das zuvor erwähnte PMBL oder das durch seine ALK- Translokation genetisch distinkte  $Alk^{+}$ -LBCL, ebenso wie die nicht klassifizierbaren Grauzonen Lymphome(18).

Trotz der Unterteilung der LBCL in vier Gruppen und diverse Subentitäten bleibt das DLBCL eine unzureichend stratifizierte Entität: Etwa 90% der LBCL werden unter die DLBCL- NOS subsummiert (18, 48).

**Tabelle 1.1**

<b>WHO Klassifikation 2008 Großzellige B- Zell Lymphome</b>	
<b>I) DLBCL NOS</b>	
<b>II) DLBCL Subtypen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primäres ZNS DLBCL</li> <li>• Primär kutanes DLBCL</li> <li>• EBV<sup>+</sup> DLBCL des Älteren</li> <li>• DLBCL assoziiert mit chronischer Entzündung</li> </ul>	
<b>III) Sonstige LBCL</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PMBL</li> <li>• Intravaskuläres LBCL</li> <li>• Alk<sup>+</sup> LBCL</li> <li>• HHV8<sup>+</sup> LBCL</li> <li>• Primäres Erguss Lymphom</li> <li>• T- Zell/ Histiocyten reiches LBCL</li> <li>• Plasmablastisches Lymphom</li> <li>• Lymphomatoide Granulomatose</li> </ul>	
<b>IV) Grauzonen Lymphome</b>	

**Tabelle 1.1:** Klassifikation der Großzelligen B-Zell Lymphome (LBCL) nach WHO in vier Subgruppen. EBV= Epstein- Barr Virus, PMBL= Primär mediastinales B- Lymphom; Alk= Alkalische Leukozyten Phosphatase; HHV8= Human Herpes Virus. Nach Swerdlow *et al.* *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. 4th ed. Lyon: IARC; 2008*

Obwohl sich aus der Zuordnung zu einigen Entitäten prognostische Rückschlüsse ziehen lassen, wie beispielsweise die günstige Prognose der PMBL oder der tendenziell ungünstige Verlauf der primären ZNS Lymphome, lässt sich für den Großteil der LBCL aus obigen Klassifikationen keine prognostische Vorhersage treffen(49).

Diverse Modelle wurden zur Risikobewertung des einzelnen Patienten eingeführt. Aufgrund ihres Stellenwerts in dieser Arbeit sollen der Internationale Prognostische Index und die Subtypisierung nach Ursprungszelle im Folgenden ausführlicher erläutert werden.

1971 propagierten Carbone et al. mit der Ann- Arbor Klassifikation eine Einteilung des Krankheitsstadiums der NHL. Stadien I und II entsprechen eher lokalisierten Stadien, III bezeichnet ein fortgeschrittenes und IV ein disseminiertes Krankheitsstadium. Informationen zu extranodaler Beteiligung, B- Symptomen und dem Befall bestimmter Organe konnten durch einen zusätzlichen Buchstaben angezeigt werden. Ziel dieses Staging- Verfahrens war es Einschätzungen über Therapiestrategie und Prognose zu erlauben (50).

Auch die Zytomorphologie der Lymphomzellen hat Auswirkungen auf die Prognose. In einer Studie wurden die prognostischen Implikationen des immunoblastären Phänotyps bei Patienten über 60 Jahre unter Chemoimmuntherapie untersucht. Ein Anteil von weniger als

10% der Lymphome zeigte eine immunoblastäre Morphologie. Immunoblastäre Zytomorphologie identifizierte unabhängig von der IPI- Risikokonstellation im Vergleich zu anderen Zellmorphologien ein Patientenkollektiv mit geringerem Therapieansprechen und unterlegenem Gesamtüberleben (51, 52).

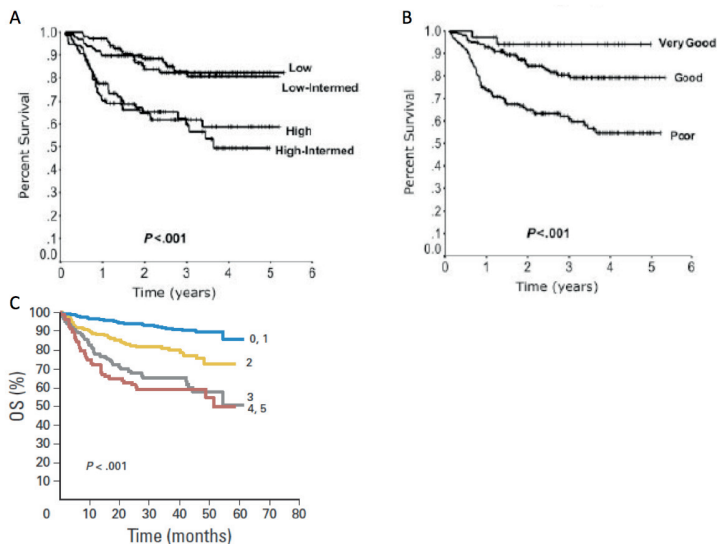
#### **1.4.1 Internationaler Prognostischer Index**

Als Werkzeug zur prognostischen Stratifizierung aggressiver NHL etablierten Shipp et al. im Jahre 1993 den Internationalen Prognostischen Index, kurz IPI. Dieses Modell weist die Patienten entsprechend der Summe der Risikofaktoren aus Krankheitsstadium Ann- Arbor III/IV, klinische Performance ECOG >2, extranodale Manifestationen  $\geq 2$ , Alter >60 und Erhöhung der Laktat- Dehydrogenase vier Risikogruppen zu. Die geschätzten fünf Jahres Überlebensraten reichten von 73% in der Niedrig- Risiko Gruppe über 51% und 43% bei intermediärem Risiko bis 26% in der Hochrisiko Kategorie. Bei Patienten jünger als 60 Jahre wurde ein altersadaptiertes Verfahren angewendet, das lediglich LDH, Tumorstadium und den Allgemeinzustand berücksichtigt. In diesem jüngeren Patientenkollektiv zeigten die vier Risikogruppen einen erwartbar leicht günstigeren Verlauf mit Überlebensraten von 83%, 69%, 46% und 32%. Die ungünstige Prognose begründete sich wesentlich auf die höheren Rezidivraten und das schlechtere Ansprechen auf die Therapie. Verschiedene Studien zeigten eine relativ gleichmäßige Verteilung der Patienten auf die Risikogruppen. Am ehesten zeigte die Niedrigrisiko Kategorie eine leichte Prädominanz in der Gruppenstärke (52-55). Die IPI- Risikoeinstufung ergänzte die Ann- Arbor Klassifikation und trug zur genaueren Einschätzung der Prognose der Patienten mit aggressiven Lymphomen bei (53).

Sehn et al. präsentierten Daten die dem Standard- IPI in der Rituximab- Ära nur eingeschränkte Aussagekraft einräumten, da Patienten unter Rituximab- Immunotherapie lediglich auf zwei prognostische Gruppen aufgeteilt wurden. Es wurde daher eine alternative Zuordnung der Anzahl der Risikofaktoren zu den jeweiligen Risikogruppen vorgeschlagen. In diesem revidierten IPI (r-IPI) zählen Patienten ohne Risikofaktoren zur Niedrigrisiko Kategorie und jene mit mehr als 2 Risikofaktoren zur Hochrisiko- Kategorie. Die Übrigen bilden eine Gruppe mit intermediärem Risiko. Die sehr gute Prognose der kleinen, etwa 10% der Patienten umfassenden Niedrigrisiko Gruppe spiegelte sich in 4- Jahres Überlebensraten von 94% wieder. Die restlichen 90% der Patienten verteilten sich gleichermaßen auf die

prognostisch günstige und ungünstige Gruppe. Hier wurden 4- Jahres Überlebensraten von 79% und 55% respektive berichtet (54).

Der Standard- IPI bleibt indessen die am häufigsten verwendete Methode der Prognostik (9, 56). Ziepert et al. publizierten eine Studie über den Stellenwert des Standard- IPI unter R- CHOP, basierend auf den Daten dreier prospektiver Studien an R- CHOP therapierten Patienten. Obschon die Risiko- Relation der prognostischen Gruppen untereinander auch in der Rituximab- Ära vergleichbar blieb, verringerten sich aufgrund des therapeutischen Benefits der Immuntherapie für alle Gruppen die absoluten Risikodifferenzen. Für die vier Risikokategorien wurden Dreijahres- Überlebensraten zwischen 91% und 59% berichtet (52). Die Ergebnisse einer weiteren Studie unter Patienten älter als 60 Jahre unterstützten die prognostische Bedeutung des Standard- IPI unter Immuntherapie. In diesem Patientenkollektiv konnten zwischen der Niedrig- und Niedrig- Intermediären Risikokategorie keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben detektiert werden. Die Anwendung eines weiteren Alterstrennwertes, Alter über 70 Jahre, als Elderly- IPI konnte diese prognostische Unschärfe beheben. Der ebenfalls evaluierte r- IPI unterschied in Patienten über 60 Jahren nur zwei signifikant abweichende Kategorien: prognostisch günstig und ungünstig. Die prognostisch exzellente Gruppe ist hier aufgrund des Risikofaktors Alter >60 Jahre nicht vertreten (57).



**Abb. 1.2:** Kaplan Meyer Überlebensschätzer nach IPI- Risikokategorien. Aus *Sehn et. al. (54)*: Verlaufskurven getrennt nach der Anzahl an IPI Risikofaktoren (A) und zusammengefasst in Gruppen des r-IPI (B). Aus *Ziepert et al. (52)*: Verlaufskurve nach Anzahl der Risikofaktoren (C).

Keine der zuvor erwähnten IPI- Modifizierungen der Rituximab- Ära konnte ohne sich auf bestimmte Altersgruppen zu beschränken eine Risikogruppe mit einer Fünf- Jahres- Überlebensrate von  $<50\%$  identifizieren (52, 54). Dies gelang jedoch mit den 2014 von Zhou et al. propagierten Änderungen zum NCCN- IPI:

Ein Patientenalter über 40 Jahre wurde bereits mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Statt die Anzahl extranodaler Beteiligungen zu werten, wurde lediglich der Befall größerer Organe wie Knochenmark, ZNS oder dem GI- Trakt als ungünstig eingestuft. Weiterhin wurde eine LDH- Erhöhung über mehr als das Dreifache der Norm als zusätzlicher Risikofaktor aufgenommen. Unter Berücksichtigung dieser Modifikation konnte der NCCN- IPI auch Risikokategorien mit Fünf- Jahres Überlebensraten von  $<50\%$  identifizieren. Die berichteten Überlebensraten reichten von 33- 96% (55).

## 1.4.2 Immunhistochemische und molekulargenetische Stratifizierung

In den jüngsten WHO Klassifikationen von 2008 und 2016 gewinnen molekulargenetische und immunphänotypische Eigenschaften zunehmend an Bedeutung. Das Zusammenfallen

zweier Translokationen mit c- Myc und bcl2/-6 beispielsweise, wird jetzt in die Kategorie der „double hit“ Lymphome eingeordnet. Die gleichzeitige Expression von c-Myc und bcl-2, wie bereits im Kapitel Biologie erwähnt, wird als eigenständiger Risikofaktor unter den DLBCL-NOS aufgeführt. Und die in der Auflage von 2008 zunächst nur anerkannte molekulargenetische Unterteilung des DLBCL nach seiner Ursprungszelle wird in der aktuellen Auflage von 2016 nun aktiv propagiert (18, 33, 48).

In der Hoffnung, einerseits eine prognostische Aussage für die, durch den IPI unzureichend erfassten Patienten mit sehr ungünstigem Verlauf und andererseits speziell an dieses Kollektiv adaptierte Therapien zu finden, gewinnt die Stratifizierung der DLBCL unter molekulargenetischen Aspekten zusehends an Bedeutung. Im Gegensatz zu zuvor erwähnten prognostischen Werkzeugen birgt die Unterteilung dieser Lymphome nach ihrer Ursprungszelle das große prädiktive Potential für den jeweiligen molekulargenetischen Subtyp eine besonders effektive Therapiestrategie zu finden (49).

Anfang dieses Jahrtausends wurde das Konzept etabliert DLBCL mithilfe von Genexpressionsprofilen in prognostisch günstige GCB- und die prognostisch ungünstigen nicht-GCB- Lymphomen zu unterscheiden (15). Unter Polychemotherapie wurden 5- Jahres Überlebensraten von 62% vs. 26% für GCB- und ABC- Lymphome respektive beschrieben (16). Rosenwald et al. stellten neben die beiden oben genannten Subtypen einen dritten Subtypen, der weder die für das GCB- noch das ABC- Muster charakteristischen Gene exprimiert und daher „nicht- klassifizierbar“ bezeichnet wurde(58).

Genexpressionsprofile (GEP) sind bis heute teuer und nur eingeschränkt verfügbar, auch wenn mittlerweile Verfahren zur Verfügung stehen, die anstelle von frischem Gewebe an Formalin fixiertem, in Paraffin gebettetem Gewebe durchgeführt werden können. Eine kostengünstige, leicht durchführbare und weitreichend verfügbare Alternative wurde in der Anwendung von immunhistochemischen (IHC)- Färbungen als Surrogatmarker für den Goldstandard GEP gesehen. Da kein einzelner immunhistochemischer Antikörper die Unterteilung in obige Subtypen mit ausreichender Sicherheit vornehmen kann (59), wurden für Keimzentrums- beziehungsweise aktivierte B-Zellen charakteristische Oberflächenproteine in einen immunhistochemischen Algorithmus integriert (60-66). Der am häufigsten verwendete Algorithmus wurde im Jahr 2004 von Hans et al. publiziert (59). Dieses Modell basiert auf der Verwendung von CD10 und bcl-6 als Keimzentrumsmarker, sowie von MUM-1 als Oberflächenprotein von aktivierten, sich zu Plasmazellen differenzierenden B-Zellen (66). Unterschieden werden zwei Subgruppen: GCB- Lymphome und nicht- GCB Lymphome. Zu letzterer Gruppe zählen also auch solche Lymphome, die,

wie oben beschrieben, keinem der beiden großen Subtypen zugeordnet werden konnten. Die Konkordanz der Einstufungen durch den Algorithmus mit GEP- Resultaten variiert zwischen 75- 86% (61, 65-69) aber auch Übereinstimmung von lediglich 48% für GCB- Lymphome wurden berichtet (67). Sensitivität und Spezifität des Hans- Algorithmus lagen in einer von Meyer et al. publizierten Studie bei 90% und 83% respektive (61). Die prognostische Relevanz des Algorithmus wurde ursprünglich vor Addition der Immuntherapie zur Standardchemotherapie etabliert (66, 70). Die 5- Jahres- Überlebensraten unter CHOP- Therapie betrugen 76% für GCB- und 34% für nicht- GCB Lymphome.

Während die prognostische Aussagekraft von GEP in der Ära der Immuntherapie bestehen blieb (65, 67, 71), wurde auch die Methode der Subklassifikation des DLBCL durch IHC- Algorithmen nach Einführung der Rituximab Immuntherapie wiederholt evaluiert. Die Ergebnisse dieser Arbeiten ließen keinen einheitlichen Schluss über den Stellenwert des Algorithmus zu: Einige retrospektive Studien konnten die von Hans et al. ermittelte prognostisch signifikante Stratifizierung nicht bestätigen(51, 64, 67, 72, 73). Obschon sich die non-GCB Gruppe im Hinblick auf das Gesamtüberleben als tendenziell unterlegen herausstellte und in einer Studie auch die Gesamtansprechrate für diese Gruppe signifikant geringer war (72). Eine von Salles et al. publizierte Arbeit stützt ebenfalls die Aussagekraft der einzelnen, den Hans- Algorithmus konstituierenden IHC- Marker vor der Rituximab- Ära, konnte diesen Stellenwert aber nicht für Rituximab therapierte Patienten bestätigen(74). Indessen konnten andere retrospektive Studien die prognostische Relevanz des Hans- Algorithmus auch für das Gesamtüberleben bestätigen und den non-GCB Subtyp als vom IPI unabhängigen Risikofaktor identifizieren (61, 71).

Ebenso wie unter obigen Resultaten aus retrospektiven Analysen finden sich auch unter prospektiven Studien Ergebnisse, die für oder gegen die Signifikanz des Hans- Algorithmus argumentieren: Thieblemont et al. publizierten eine Untersuchung, die dem Algorithmus prognostische Signifikanz unter rezidierten Patienten einräumte, Cunningham et al. indessen stellten im Vergleich von R-CHOP 14 vs. R- CHOP 21 keine Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen GCB- und nicht- GCB Subtypen fest (69, 75).

Zur Kontroverse über den Stellenwert der Immunhistochemie in der Subklassifikation des DLBCL trägt auch die geringe Schnittmenge übereinstimmender Resultate unter den verschiedenen Algorithmen insgesamt bei. So wurden gerade 4% der Lymphome unter Anwendung der gebräuchlichen Algorithmen einheitlich als GCB und nur 21% einheitlich als nicht- GCB eingestuft. Allerdings zeigte der Hans- Algorithmus ein relativ hohes Maß an



Übereinstimmung innerhalb der Algorithmen im Vergleich zu den übrigen untersuchten Algorithmen(59).

Weiterhin wird das Ergebnis von Antikörperfärbungen stark von der jeweils eingesetzten Methode geprägt. Auch nach Standardisierung der Färbung fanden mehrere Publikationen insbesondere bei der Beurteilung von bcl-6 Färbungen geringe Übereinstimmungswerte von lediglich 50-80% (76, 77). Diese Information ist besonders relevant vor dem Hintergrund, dass der analog des Hans- Algorithmus bestimmte Phänotyp in etwa 70% der CD10-negativen Fälle von der Interpretation der bcl-6 Färbung abhängt(64). Die Heterogenität der in obige Studien einbezogenen Patienten im Hinblick auf Therapie und Alter hat vermutlich ebenfalls zu den uneinheitlichen Wertungen der IHC-Algorithmen beigetragen(19).

## 1.5 Klinik und Therapie des DLBCL

Als aggressives Lymphom präsentiert sich das DLBCL mit einem akuten bis subakuten Krankheitsverlauf. Ohne Therapie führt die Erkrankung im Median innerhalb eines Jahres zum Tod (78). 33% der Patienten haben bei Diagnosestellung eine B- Symptomatik, also Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust  $>10\%$  kgKG in den letzten sechs Monaten. In 24% ist die Leistungsfähigkeit eingeschränkt, entsprechend einem Karnofski- Index von  $<71\%$ . Ca. 55% haben erhöhte LDH- Werte. Etwa drei Viertel der Lymphome zeigen bei Diagnose oder im Verlauf ein Tumorkonglomerat  $\geq 5\text{cm}$ , 25-30% von  $\geq 10\text{cm}$ . Das Krankheitsstadium nach Ann- Arbor ist bei Präsentation meist fortgeschritten; ca. 46% fallen bereits in das Stadium III/ IV. Ebenso manifestiert sich das Lymphom in 71% der Fälle an extranodaler Stelle. 29% zeigten  $\geq 2$  extranodale Manifestationen. Als extranodal gelten alle nicht lymphatischen Beteiligungen, darunter auch hämatopoetische Organe wie Leber und Knochenmark. Unter den häufigsten extranodalen Stellen finden sich der Gastro- intestinal Trakt (18%) und das Knochenmark (11-19%) (18, 53, 79-81). Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems gilt als prognostisch ungünstig. 1% der Lymphome breiten sich in das ZNS aus. Die 5 Jahres Inzidenz der ZNS- Beteiligung wird mit ca. 8,4% angegeben (79, 82). 31-40% der Lymphome haben bei Diagnosestellung lediglich extranodale Manifestationen und werden daher als primär extranodale Lymphome eingestuft(47, 80).

Langjähriger Standard in der Therapie des DLBCL ist das CHOP- Regime, bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison. Vor Etablierung der

Immuntherapie konnten drei- Jahres Überlebensraten von ca. 54% erzielt werden (83). Patienten mit hoher Tumorlast erhalten zudem eine Vorphase zur Prävention des Tumorlyse-Syndroms (5). Eine bedeutende Veränderung in Prognose und Therapieregimen der NHL wurde durch die Hinzunahme von Rituximab zur Standard- Chemotherapie erreicht. Rituximab ist ein chimärer anti- CD20 Antikörper. CD20 wird auf reifen, noch nicht terminal differenzierten B- Zellen exprimiert.

Eine Studie aus British Columbia, Kanada belegte erstmals retrospektiv den Überlebensvorteil unter Rituximab- Therapie: nach dortiger Zulassung des Antikörpers verbesserte sich das drei Jahres- Gesamtüberleben im Vergleich zur prä-Rituximab Ära um ca. 20% (84). Mehrere Studien zeigten den Nutzen von Rituximab besonders für ältere, über 60- Jährige (85-88) und jüngere, niedrig- Risiko Patienten(89). Rezidive treten vorwiegend innerhalb der ersten zwei Jahre nach Therapiebeginn auf. Die Rezidiv Rate in diesem Zeitraum beträgt auch unter Rituximab- Therapie immer noch ca. 30%. 7% aller Rezidive treten als Spätrezidive 5 Jahre post Therapiebeginn auf (84, 85).

Über die genaue Anzahl der Zyklen, die Zyklusdauer sowie den Stellenwert der Radiatio wird abhängig von der IPI- Risikostratifizierung, der Krankheitsausbreitung und des Patientenalters entschieden:

Junge Patienten mit einem oder keinen Risikofaktoren erhalten sechs Zyklen R- CHOP 21, eventuell mit Radiatio eines Tumorkonglomerats oder extranodalen Befalls. Die Prognose dieser Patientengruppe ist exzellent (89-91).

Patienten älter als 60 Jahre werden entweder analog des R- CHOP 14 oder -21 Protokoll therapiert, wobei die zweiwöchige Zyklusdauer bei gleicher Effektivität mit einer kürzeren Therapiezeit und niedrigeren Anthrazyklindosen einhergeht. Hier wurden unter Applikation von R- CHOP 14 über sechs Zyklen fünf- Jahres- Überlebensraten von 72% berichtet(75, 92). Die Diagnostik der Ursprungszelle via GEP oder IHC- Algorithmen hat bis dato nur einen geringen Stellenwert in der Therapiewahl. Die subtypenspezifische Biologie des ABC- bzw. GBC- Phänotyps wird allerdings mit zunehmender Tendenz in die Wahl neuer Therapeutika mit einbezogen. In sogenannten XR- CHOP Kombinationen wird der Nutzen dieser Medikamente supplementär zur Standardtherapie untersucht. Relevante Ansatzpunkte zur medikamentösen Intervention in die onkogenen Mechanismen sind unter anderem PI3K- Inhibitoren bei GCB- Lymphomen mit PTENdel oder auch bcl-2 Inhibitoren bei Vorliegen einer bcl-2 Translokation in diesem Phänotyp. Bortezomib und Ibrutinib greifen indessen als Proteasom- bzw. Bruton Tyrosin- Kinase- Inhibitoren in den NFκB- und B- Zell- Rezeptor Signalweg des ABC- Subtyps ein. Auch Lenalidomid als Angiogenese und NFκB- Inhibitor

16

zeigte in einer Phase II Studie vielversprechende Resultate und konnte die Prognoseunterschiede zwischen beiden Subtypen egalisieren(45, 93, 94).

## 1.6 Überblick und Zielsetzung

Die WHO- Klassifikation von 2008 differenzierte unter klinisch- anatomischen Gesichtspunkten multiple Entitäten aus dem Kreis der Großzelligen- B- Zelllymphome. Die meisten Patienten wurden nichtsdestotrotz unter der Gruppe der nicht näher bezeichneten Lymphome DLBCL- NOS subsumiert (18). Diese Entität ist also das „Sammelbecken“(49) vieler Tumorerkrankungen, die biologisch, klinisch und prognostisch eine große Vielfalt aufweisen. Ziel dieser Arbeit ist es, die gängigen Werkzeuge zur prognostischen Stratifikation dieses Patientenkollektivs am Standort Giessen zu evaluieren. Hierzu wurde der Standard- IPI als am häufigsten verwendete klinische Risikoeinteilung mit dem gebräuchlichsten Immunhistochemischen Algorithmus, dem Hans- Algorithmus verglichen.

## **2. Methodik**

### 2.1 Auswahlkriterien

In die retrospektive Analyse wurden alle Patienten eingeschlossen, die seit Januar 2007 am Uniklinikum Gießen mit einem DLBCL diagnostiziert wurden. Aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie wurde, nach Einholung eines Ethikvotums, auf eine Informierte Einwilligung der Patienten verzichtet.

In der Datenbank des Klinikums wurden, der Internationalen statistischen Klassifikation der WHO folgend, alle von 2007 bis 2011 unter der ICD-10 C83.3 gelisteten Fälle aufgerufen. Patienten mit rezidivierter Lymphomerkrankung, deren Erstdiagnose vor 2007 datiert wurden ausgeschlossen. Die forthin in der Analyse verbliebenen Datensätze bezogen sich auf alle Patienten, deren klinische Diagnose durch den pathologischen Befundbericht eines CD20-positiven DLCL bestätigt werden konnte. Ausgenommen waren, nebst jenen Fällen in denen kein pathologischer Befundbericht vorlag, primär mediastinale großzellige Lymphome.

Follikuläre Lymphome haben in der Regel einen CD10- positiven Immunphänotyp. Da CD10 ebenfalls in den Hans- Algorithmus einfließt und CD10- positive, sekundäre Lymphome die prognostisch ungünstige Konstellation von Patienten mit Richter- Transformation aufweisen (95), wurden sekundäre Lymphome explizit nicht eingeschlossen.

## 2.2 Patientendaten und – Parameter

Als Datengrundlage wurden die elektronischen Patientenakten am Standort Gießen herangezogen. Darin enthaltene Arztbriefe, Laborparameter und Verlaufshistorien des stationären Aufenthaltes, beziehungsweise der ambulanten Betreuung und hämatologische Befundberichte sowie Befunde sonstiger Abteilungen wurden zur Datenerhebung genutzt. Hierbei wurde nicht zwischen kliniksintern oder -extern erstellten und elektronisch gespeicherten Dokumenten differenziert. Die Dokumentation der Histologie und Immunhistochemie in einem Arztbrief, Befundbericht oder den Patientenstammdaten wurde zur Bestätigung der in der ICD hinterlegten Diagnose eines DLCL als hinreichend erachtet.

Tabellen 2.1 und 2.2 fassen die in unserer Analyse registrierten Patientencharakteristika zusammen.

**Tabelle 2.1 Klinische und laborchemische Parameter**

<b>Patientencharakteristika</b>	Alter	Geschlecht
	Erstdiagnose	Allgemeinzustand (ECOG)
<b>Klinische/ laborchemische Parameter</b>	Extranodaler Befall	LDH
		Ann- Arbor Stadium
	Tumorkonglomerat $\geq 10$ cm	Knochenmarkinfiltration
	Hämoglobin	B Symptome
<b>Therapie und Verlauf</b>	Therapieansprechen	Therapieschema
	letzte Wiedervorstellung	Gesamtüberleben
	Progressfreies Überleben	

**Tab. 2.1:** ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group, LDH= Laktat- Dehydrogenase

**Tabelle 2.2 Immunhistochemische Charakteristika**

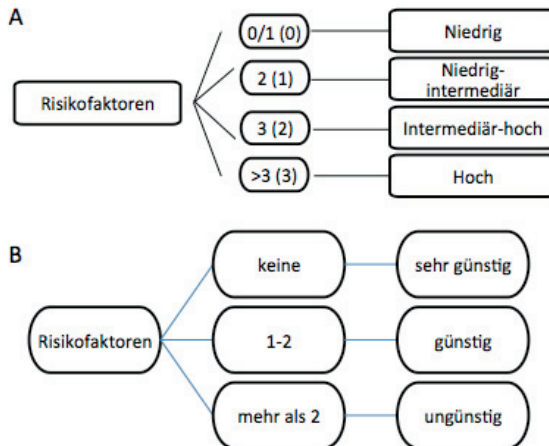
<b>Immunhistochemische Parameter</b>	MIB1 (Ki-67)	c-MYC
	Bcl-2	CD10
	Bcl-6	MUM-1

Das Alter zum Analysezeitpunkt errechnete sich aus der Differenz des Alters bei Erstdiagnose und des Geburtstages.

Der IPI wurde als Summe aus den Punktwerten für

- erhöhte LDH (>240 U/l)
- eingeschränkten Allgemeinzustand (ECOG $\geq$ 2)
- Alter über 60 Jahre
- mehr als ein extranodales Infiltrat und
- Ann-Arbor Stadium III/IV gebildet.

Für jeden der oben aufgeführten Risikofaktoren erhöht sich die Summe um einen Punkt. Bei Patienten jünger als 61 Jahre fand der altersadaptierte IPI unter Vernachlässigung der extranodalen Manifestationen Anwendung (53). Anschließend folgte die Stratifizierung nach Risikogruppen analog dem Standard-IPI und dessen revidierter Form, dem R-IPI (53, 54).



**Abb. 2.1:** Stratifizierung nach IPI- Risikofaktoren und -Gruppen

*Tafel A:* Zuordnung der Risikogruppen in Abhängigkeit der Anzahl der Risikofaktoren nach Standard-IPI; aaIPI in Klammern. *Tafel B:* Distribution der Risikofaktoren nach revidiertem IPI (53, 54)

Als extranodaler Befall wurden alle Manifestationen außerhalb von Lymphknoten, insbesondere in Leber, Knochenmark und dem zentralen Nervensystem eingestuft. Zunächst

wurde die absolute Anzahl der affektierten Organe erfasst und anschließend in Stufen von 0, 1, >1 befallenen Organ unterteilt.

Der Grenzwert für eine erhöhte LDH lag im Zentrallabor der Universitätsklinik Giessen bei 240 U/l. Extern ermittelte LDH- Spiegel wurden nach dem Gießener Referenzwert beurteilt. Bezugswert war der höchste Messwert unmittelbar vor Diagnosestellung, nachgewiesen im Laborverlauf oder Arztbrief.

Der Allgemeinzustand wurde nach ECOG- Schema erfasst (96). Bei unzureichender Dokumentation wurde die Art der Therapiedurchführung als Surrogatparameter für den Allgemeinzustand des Patienten hinzugezogen: Konnte die Therapie ambulant durchgeführt werden, wurde der ECOG auf <2, im Falle eines stationären Aufenthaltes auf  $\geq 2$  geschätzt. Das Staging erfolgte nach Ann- Arbor- Klassifikation (50) aus der Auswertung von Befunden der körperlichen Untersuchung, sowie radiologischer und pathologischer Befundberichte, sofern diese mit dem in Arztbriefen oder Stammdaten hinterlegten Stadien kongruent waren. Im Falle fehlender Kongruenz des durch Befunde suggerierten Stadiums und des in der Patientenakte dokumentierten Stadiums erfolgte die Stadieneinteilung basierend auf der Interpretation der Befundberichte.

B-Symptome sind definiert als Nachtschweiß, Fieber oder >10% Gewichtsverlust in den vorangegangenen sechs Monaten (50). Die Dokumentation eines dieser drei Symptome auch ohne nähere Quantifizierung bei Fieber und Nachtschweiß, oder der Vermerk über das Auftreten von B-Symptomen in der Patientenakte wurde als hinreichendes Kriterium für das Vorliegen von B-Symptomen gewertet.

Tumorkonglomerate wurden bei deren Erwähnung in CT- Befundberichten, archivierten Arztbriefen oder Verlaufsdokumentationen registriert. In den Befunden erfasste Tumorkonglomerate wurden auch ohne näher beschriebenen Durchmesser in unsere Datenerfassung übernommen. Das Knochenmark wurde als infiltriert eingestuft, wenn dies so in der Patientenakte erfasst war oder die Infiltration in einem pathologischen Befundbericht angegeben wurde. Sofern ein low-grade Lymphom im Knochenmark mit einer extramedullären Manifestation des DLBCL koexistierte und dessen Auftreten in den Zeitraum vor Diagnosestellung des DLBCL fiel, wurde das DLBCL als sekundäres Lymphom gewertet und von der Analyse ausgeschlossen.

Therapieschema und –ansprechen wurden aus der Patientenakte übernommen. Hinsichtlich des Therapieschemas wurden Therapien nach R- CHOP Schema und von dieser Standardtherapie abweichende Schemata abgegrenzt. Sofern verfügbar wurde ebenfalls die

Intervalldauer zwischen den jeweiligen Therapiezyklen protokolliert. Fanden sich keine Angaben zum Therapieansprechen in den Patientenakten, wurde ein den kompletten Beobachtungszeitraum umspannendes, rezidivfreies Überleben als Surrogatparameter für ein komplettes Ansprechen (CR) interpretiert. Das Progressionsfreie Überleben entspricht dem Intervall zwischen Tag1 der Ersttherapie und dem zuletzt ersichtlichen Wiedervorstellungstermin in Remission, beziehungsweise dem Beginn der nächsten Therapie für solche Patienten, deren Rezidivdatum nicht eindeutig belegt war. Das Überleben wurde von Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt des letzten ermittelbaren Patientenkontakts gemessen. Hierbei wurde einerseits zwischen Verstorbenen und andererseits zwischen Patienten, die die Erkrankung überlebten oder deren Überleben nicht widerlegt wurde, unterschieden.

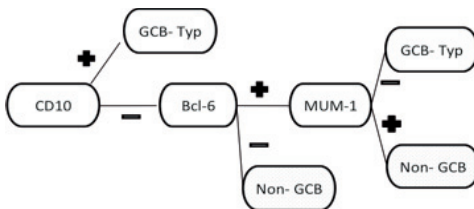
Seit der Publikation des Hans- Algorithmus wurden diverse Algorithmen propagiert, die den Immunphänotyp des Lymphoms als Surrogat für die Ursprungszelle interpretieren (60, 61, 63-65). Der Hans- Algorithmus bleibt jedoch das am häufigsten verwendete Verfahren und das Verfahren mit der größten Konkordanz zu den Ergebnissen anderer Algorithmen (67). Die Rationale für die Verwendung des Hans- Algorithmus im Rahmen der Evaluation der Prognostik am Universitätsklinikum Giessen basierte neben oben Genanntem auf dem Bekanntheitsgrad der Methode und, damit einhergehend, auf der besseren retrospektiven Datenqualität.

Aus den histopathologischen Befunden wurden folgende immunhistochemische Parameter erfasst: CD10, bcl- 2, bcl- 6, MUM-1, c-Myc, MIB1 (Ki- 67). Unter den Umständen, dass die relative Expressionshäufigkeit (in %) zwischen zwei Werten angegeben wurde, floss nur der als niedriger angegebene Wert in die Analyse ein.

### 2.3 Immunhistochemische Nachanalyse

Jene Fälle die auf Grundlage archivierter Befunde nicht klassifiziert werden konnten, wurden im Institut für Pathologie der Universität Gießen nachanalysiert. Die immunhistochemischen Färbungen CD10, bcl- 6, MUM1 und bcl- 2 wurden, sofern nicht bereits beschrieben, an formalinfixiertem, paraffiniertem Biopsiematerial nach Routineverfahren durchgeführt. Anschließend wurde in Zusammenschau mit den Originalschnitten des jeweiligen Falles evaluiert: CD10- und bcl-2- positive Zellen zeigen bei spezifischer Reaktion typischerweise ein auf die Zellmembran beschränktes Färbemuster, bcl- 6 und MUM1 eine nukleäre Färbung.

Wenn  $\geq 30\%$  der Tumorzellen die für die Immunfärbung spezifische Reaktion zeigten, wurde das Lymphom für den jeweiligen Marker als positiv eingestuft. Bei bcl- 2 lag der Grenzwert bei  $\geq 50\%$  (66, 97). Als Parameter der Färbereaktion dienten präparatsinterne Kontrollen: CD10 färbt neutrophile Granulozyten, Keimzentrumszellen und den Stromahintergrund. MUM1 färbt eingestreute Plasmazellen, bcl- 6 Keimzentren und follikuläre T-Zellen. Waren trotz des Vorkommens interner Kontrollen im mikroskopischen Bild keine Zellen mit spezifischer Färbereaktion detektierbar, wurde die Färbung als inkongruent eingestuft und floss nicht in die Auswertung ein. Eine Graduierung in der Intensität der Färbereaktion fand keine Berücksichtigung in der Auswertung. Die Stratifizierung vollzog sich entlang des von Hans et al. beschriebenen Algorithmus:



**Abb. 2.2:** Immunhistochemische Stratifizierung modifiziert nach Hans et al., 2004

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Erfassung der Patientendaten und deren statistische Auswertung erfolgte in Microsoft Excel. Die Wahrscheinlichkeit für Mortalität oder Krankheitsprogress wurden mithilfe von Kaplan- Meier- Kurven geschätzt. Primärer Endpunkt war das Gesamtüberleben nach vier Jahren. Des Weiteren diente das progressionsfreie Überleben zu oben genanntem Zeitpunkt als zusammengesetzter Endpunkt aus Progress beziehungsweise Tod. Die Studienendpunkte wurden in dieser Reihenfolge hierarchisch gewichtet. Der statistische Vergleich zwischen zwei Kurven stützte sich auf Logrank- bzw. Haenszel-Cox Tests unter Berücksichtigung des Anteils zensierter Ereignisse. Als Vergleichsparameter wurden die mediane Dauer bis zum Eintritt eines Ereignisses, die Hazard- Ratio sowie der Interquartilen Abstand als Maß für die Streuung der zugrundeliegenden Daten herangezogen. Kaplan- Meyer Kurven wurde mithilfe von Microsoft Visual Basic generiert. Homogenitätsanalysen zwischen Vergleichsgruppen basierten auf einer Chi- Quadrat Unabhängigkeitstest. Alle p- Werte wurden für zweiseitige Tests errechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  festgelegt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patienten

Im Zeitraum von 2007 bis 2011 stellten sich insgesamt 143 Patienten zur Therapie eines Diffus Großzelligen B-Zell Lymphoms am Uniklinikum Gießen vor. Unter diesen Patienten fanden sich 91 neudiagnostizierte Fälle eines de novo Lymphoms. Bei unzureichender Dokumentation der pathologischen Diagnosestellung wurden 21 Fälle nicht weiterverfolgt. Die 70 Lymphomdiagnosen untergliedern sich in 61 der WHO- Kategorie DLCL non-otherwise-specified (nos), fünf primäre ZNS Lymphome, ein Grauzonenlymphom mit Charakteristika zwischen Burkitt Lymphom und DLCL und drei B-Zell Neoplasien der Gruppe der primär kutanen DLCL. Aus diesen 70 Fällen waren letztlich 50 Lymphome der Subklassifizierung nach Hans zugänglich. Zwei Fälle wurden wegen des inkongruenten Färbemusters der Immunhistochemie ausgeschlossen. 48 Fälle untergliedern sich in die WHO- Entitäten DLCL not-otherwise-specified (42), primäre ZNS Lymphome (3), primär kutane DLCL (2) und ein Grauzonenlymphom mit Charakteristika zwischen Burkitt Lymphom und DLCL.

Unter den 48 Patienten fanden sich 28 Frauen (58 %) und 20 Männer (42 %) mit einer weiblichen Prädominanz von 1,4:1. Die Altersspanne bei Erstdiagnose reichte von 33 bis 88 Jahren bei einem medianen Altersschnitt von 67,5 Jahren.

Eine Zusammenfassung der Patientencharakteristika findet sich in Tabelle 3.1.

**Tabelle 3.1 Patientencharakteristika**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Anzahl(%)</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Anzahl(%)</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Anzahl(%)</b>
<b>Alter</b>		<b>Todesfälle</b>		<b>Ann-Arbor</b>	
<61 Jahre	13 (27)	48 Mo	18 (38)	I	16 (33)
≥61 Jahre	35 (73)			II	12 (25)
<b>Geschlecht</b>		<b>LDH</b>		III	7 (15)
männlich	20 (42)	erhöht	24 (50)	IV	13 (27)
weiblich	28 (58)	<b>B-Symptome</b>	19 (40)	<b>ENM</b>	
<b>Therapie</b>		<b>ECOG</b>		0	10 (21)
R- CHOP	35 (73)	<2	29 (60)	1	27 (56)
Andere	13 (27)	≥2	19 (40)	≥2	11 (13)
<b>KM-infiltration</b>	6 (13)				

**Tab. 3.1:** Klinische Eigenschaften und deren Häufigkeit unter analysierten Patienten. Angaben in Klammern: relativer Anteil (in %) im Bezug auf Gesamtkollektiv. R- CHOP= Rituximab und Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison, ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase, ENM= Extranodale Manifestationen des Lymphoms

## 3.2 Krankheitscharakteristika

### **3.2.1 Parameter des International Prognostic Index**

In der Auswertung des Internationalen Prognostischen Index wird im Folgenden auf die Resultate bezüglich Prävalenz und Distribution der Einzelfaktoren Krankheitsstadium Ann-Arbor ≥3, Alter >60 Jahre, ECOG- Status ≥2, ein erhöhtes LDH- Niveau und mindestens zwei extranodale Manifestationen eingegangen.

Bei Erstdiagnose befanden sich 16 Patienten (33 %) im Krankheitsstadium I nach Ann- Arbor, 12 (25%) in Stadium II, 7 (15%) im Stadium III und 13 Patienten (27%) im Stadium IV. Das Kriterium Ann- Arbor Stadium ≥3 vereinten demnach 20 Patienten (42%) auf sich.

35 Patienten (73%) waren bei Diagnosestellung älter als 60 Jahre. Der Altersmedian in dieser Gruppe lag bei 73 Jahren. Das Alter in der Kohorte der Unter- 61- Jährigen lag im Median bei 45 Jahren.

Die Leistungsfähigkeit der Patienten gemessen am Aktivitätsindex ECOG lag im arithmetischen Mittel bei 1,8 Punkten. Die Aktivitätswerte umspannten die gesamte Skala von null bis fünf Punkten. 19 Patienten (40 %) befanden sich bei Erstdiagnose in deutlich reduziertem oder schlechtem Allgemeinzustand (ECOG ≥ 2).

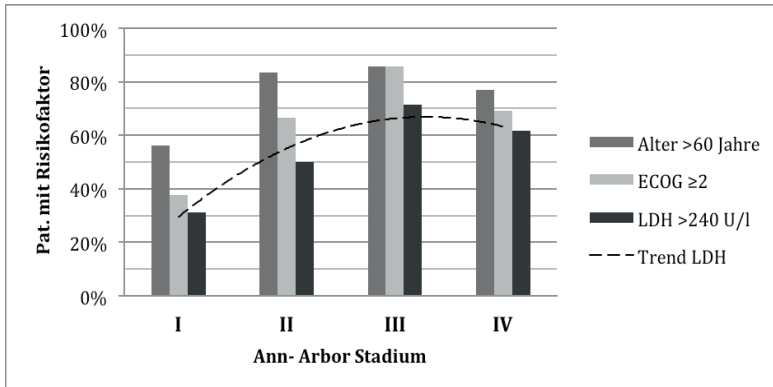
Eine normwertige LDH konnte bei 24 Patienten festgestellt werden. In 24 Fällen (50% d. Pat.) wurden erhöhte LDH- Spiegel gemessen. Die Spannweite der Messwerte reichte von 97 bis 1982 U/L, der mittlere LDH- Spiegel betrug 304 U/L.

In 11 Fällen wurden mindestens zwei Lymphommanifestationen außerhalb des Lymphatischen Systems gefunden, was einem Anteil von 23 % entspricht. Die Breite der dokumentierten Herde lag zwischen null und vier befallenen Organen.

Neben obigen Faktoren des IPI- Scores wurde das Auftreten von B- Symptomen, eine Knochenmarksinfiltration und das Vorliegen eines Tumorbulks unter den weiteren Risiko- und Begleitfaktoren der Lymphomerkkrankung erfasst.

Eine Infiltration des Knochenmarks durch das Lymphom wurde in sechs Fällen dokumentiert. Bei vier Patienten wurde ein mediastinales Tumorkonglomerat als sogenannte bulky disease beschrieben. Des Weiteren traten bei 19 Patienten B- Symptome auf.

In Abbildung 3.1 wird das Auftreten der Risikofaktoren Alter >60 Jahre, erhöhte LDH- Level und verminderter Allgemeinzustand ( $\text{ECOG} \geq 2$ ) in Zusammenhang mit dem Fortschreiten des Krankheitsstadiums nach Ann- Arbor gebracht. In Stadium I ließen sich bei 31%, 38% und 56% der Patienten respektive erhöhte LDH- Werte, ECOG Werte  $\geq 2$  und ein Alter über 60 Jahren feststellen. Die Prävalenz dieser drei Faktoren stieg mit zunehmendem Krankheitsstadium. Die größte Prävalenz dieser Risikofaktoren hatten Patienten in Stadium III; 71% hatten erhöhte LDH- Werte, 86% der Patienten jeweils  $\text{ECOG} \geq 2$  und ein Alter >60 Jahren. Im Ann- Arbor Stadium IV sinkt die Prävalenz unter das Niveau des vorigen Krankheitsstadiums, der Anteil der über 60 –Jährigen sinkt unter den Wert in Stadium II (83% in Stadium II, 77% in Stadium IV). In untenstehendem Diagramm wird dieser Trend beispielhaft am Anteil der Patienten mit LDH- Erhöhung demonstriert.

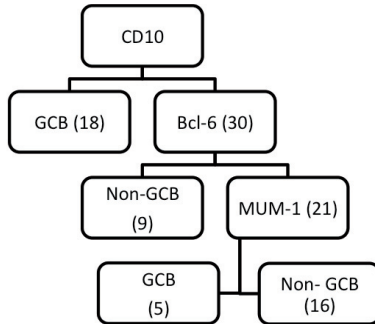


**Abb. 3.1** Auftreten von IPI- Risikofaktoren je Krankheitsstadium

Die Säulen zeigen den prozentualen Anteil an Patienten mit den untersuchten Risikofaktoren im jeweiligen Krankheitsstadium. Die gestrichelte Linie nähert den Trend der Prävalenz von Patienten mit LDH- Erhöhung mit zunehmendem Ann- Arbor Stadium. ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase.

### 3.2.2 Immunhistochemie und Ursprungszelle

In der Zusammenschau der Auswertung der immunhistochemischen Analyse und der vordiagnostizierten Fälle zeigten sich 23 keimzentrumsartige Lymphome sowie 25 Lymphome mit einem den aktivierten B- Zellen ähnlichen Immunphänotyp. 18 Lymphome wurden bei Expression von CD10 dem Keimzentrumstyp zugeordnet. In gleiche Kategorie fielen weitere 5 CD10- negative Neoplasien aufgrund positiver Bcl-6 sowie negativer MUM1- Konstellation. Die sonstigen 25 der 30 CD10- negativen Neoplasien wurde so unter dem Aktivierten B-Zell-Typ subsummiert. Die Distribution des jeweiligen Immunphänotyps im Hans- Algorithmus wird in Abbildung 3.2 abgebildet. Aus den drei primären ZNS- Lymphomen wurden zwei dem non-GCB- Typ zugerechnet, ein weiteres dem GCB- Typ.



**Abb. 3.2:** Distribution von GCB- und non- GCB Lymphomen nach Hans Algorithmus(66). Angaben in Klammern: Anzahl der Fälle in der jeweiligen Algorithmusstufe.

Losgelöst vom Hans- Algorithmus betrachtet waren aus den 43 der gegen Bcl- 6 gefärbten Fälle 33 (77%) positiv. Unter gleicher Betrachtungsweise zeigten 25 (68%) der 37 auf MUM1 überprüften Lymphome eine positive Färbereaktion. Bei 43 Patienten wurde der Status der Bcl- 2 Expression erhoben. Hier konnte in 32/43 Fällen (74%) eine Positivität in der immunhistochemischen Reaktion nachgewiesen werden. Die bcl-2 positiven Lymphome in 14 der 23 GCB- Lymphome detektiert. Die MIB1- Färbung gegen das Proliferationsantigen Ki- 67 wurde in 41 Patienten erfasst. Die Werte der angegebenen Wachstumsfraktion reichten von 40- 90% mit einem Mittelwert von 75%.

Der Vergleich klinischer Risikoparameter zwischen GCB und non- GCB Lymphomen konnte in der  $\chi^2$ - Analyse keine signifikante Assoziation der erfassten Faktoren zu einem der beiden Subtypen detektieren. Patienten mit non-GCB Subtyp hatten eher erhöhte LDH- Werte, im Gegenzug aber geringfügig seltener ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium oder einen eingeschränkten Allgemeinzustand. Der Altersmedian unter Patienten mit als GCB- Subtyp eingestuften Lymphomen lag bei 69 Jahren, in der Nicht- GCB Kategorie bei 67 Jahren. Tabelle 3.2 fasst die Distribution der klinischen Parameter auf beide Subtypen zusammen.

**Tabelle 3.2 Subgruppenanalyse für klinische Risikofaktoren**

Variable	Total (%) n=48	GCB (%) n=23	Non GCB (%) n=25	p-Wert	Variable	Total (%) n=48	GCB (%) n=23	Non GCB (%) n=25	p-Wert
Alter					Extranodale Manifestationen				
≥61Jahre	35 (73)	16 (70)	19 (76)	0,62	≥2	11 (23)	5 (22)	6 (24)	0,85
<61 Jahre	13 (27)	7 (30)	6 (24)		<2	37 (77)	18 (78)	19 (76)	
Geschlecht					Ann- Arbor Stadium				
männlich	20 (42)	9 (39)	11 (44)	0,73	≥3	20 (42)	11 (48)	9 (36)	0,41
weiblich	28 (58)	14 (61)	14 (56)		<3	28 (58)	12 (52)	16 (64)	
LDH					IPI				
erhöht	24	10 (43)	14 (56)	0,39	≥2	32 (67)	16 (70)	16 (64)	0,68
normal	24	13 (57)	11 (44)		<2	16 (33)	7 (30)	9 (36)	
B- Symptome					ECOG- Status				
Positiv	19 (40)	10 (43)	9 (36)	0,60	≥2	29 (60)	15 (65)	14 (56)	0,51
Negativ	29 (60)	13 (57)	16 (64)		<2	19 (40)	8 (35)	11 (44)	

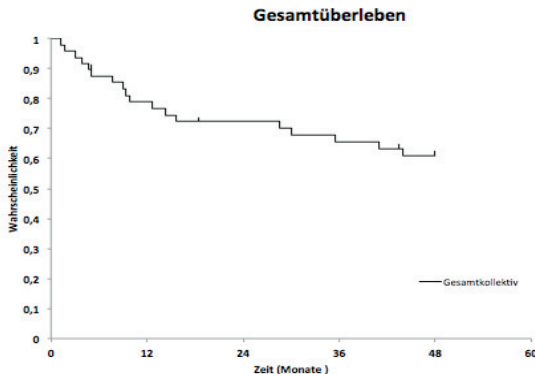
In **Tabelle 3.2** findet sich eine Aufstellung der Assoziation zwischen klinischen Charakteristika und den Subgruppen des Hans-Algorithmus. Es gab keine signifikanten Differenzen in der Häufigkeit einzelner Risikofaktoren zwischen GCB- und Non- GCB Lymphomen. Die Auswertung erfolgte auf Basis eines  $\chi^2$  Tests. Die Angaben in Klammern entsprechen dem relativen Anteil an Patienten mit dem jeweiligen IHC- Subtyp. ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase, IPI= Internationaler Prognostischer Index

### 3.3 Prognostik und Verlauf

#### 3.3.1 Gesamtkollektiv

Innerhalb der retrospektiven Analyse wurde zunächst das Überleben über einen Beobachtungszeitraum von vier Jahren erhoben. Von 48 in die Studie eingeschlossenen Patienten verstarben 18 (38 %) innerhalb dieser Zeitspanne. Bei weiteren drei Patienten ist

das Versterben im Anschluss an die 48 monatige Beobachtungsdauer belegt. 76% der Todesfälle traten binnen 24 Monaten nach Erstdiagnose auf. Die geschätzte Vierjahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 61%.



**Abb. 3.3:** Kaplan- Meyer Schätzung der Überlebensrate aller Patienten über vier Jahre.

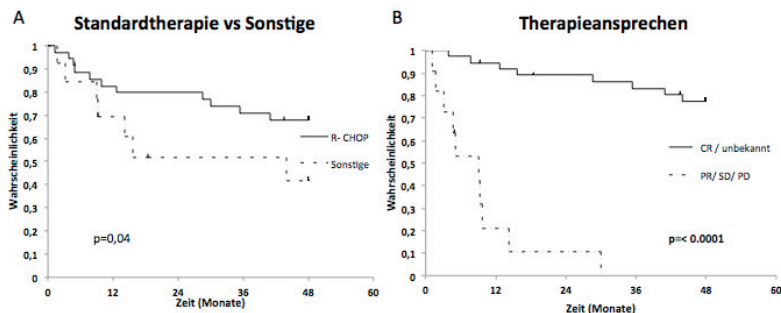
Die Rate der Patienten mit protokollierter, rezidivierter Lymphomerkkrankung lag bei 11/48 (23%). Die mediane Zeitspanne bis zum Eintritt eines Rezidivs betrug 15 Monate. Das Progressionsfreie Überleben nach 24 und 48 Monaten betrug schätzungsweise ca. 78% bzw. 69%.

Standardmäßig wurde eine Chemo- Immuntherapie mit einem Therapieschema aus sechs bis acht Zyklen R-CHOP mit insgesamt acht Rituximabgaben appliziert. Genauer betrachtet unterzogen sich 18 Patienten dieser Therapie mit einem Intervall von 21 Tagen, 11 Patienten mit einem Intervall von 14 Tagen. Zwei Schemata wiesen Intervalle von sowohl 14 als auch 21 Tagen auf. In fünf Fällen konnte aufgrund der unzureichenden Datenlage eine weitere Unterteilung der R-CHOP Therapie unter dem Gesichtspunkt der Intervalldauer nicht vorgenommen werden. 12 Patienten unterzogen sich einer dem R- CHOP Regime abweichenden Therapie. Hier ist insbesondere die in sechs Fällen applizierte R- Bendamustin Therapie zu nennen. In sieben Fällen wurden Lymphommanifestationen im Sinne einer ergänzenden Therapiemodalität einer Radiatio unterzogen. Zwei Patienten erhielten, bei initial palliativem, unimodalem Therapiekonzept ausschließlich eine Bestrahlung. Sechs von neun bestrahlten Lymphomen befanden sich bei Therapiebeginn in einem lokalisierten Krankheitsstadien (Ann Arbor I, II). Die gefundenen Unterschiede zwischen Patienten, die eine Immunchemotherapie erhielten und solchen, die sich zusätzlich einer Bestrahlung

unterzogen waren marginal und ohne statistische Signifikanz. Die Therapie der klinisch-anatomisch näher spezifizierten DLBCL- Subtypen gestaltete sich wie folgt: Unter drei primärem ZNS Lymphomen unterzog sich ein Patient zuvor erwähnter palliativer Radio. Zwei Patienten wurden analog dem Berliner- ZNS Protokoll, einer Sequenz aus Induktions- und Hochdosistherapie behandelt. Die beiden Patienten mit primär kutanem DLBCL erhielten eine Therapie aus R- CHOP bzw. R- Bendamustin respektive.

Die gefundenen Unterschiede in Gesamt- und Progressfreiem Überleben zwischen der Standardtherapie (R-CHOP 14/21) und davon abweichenden Therapien schreiben der R-CHOP Gruppe retrospektiv einen deutlich günstigeren Verlauf zu (s. Abb. 3.4).

Das Therapieergebnis wurde bei vier Patienten als partielle Remission, in zwei Fällen als stabiler Verlauf und in vier Fällen als therapierefraktär mit progredientem Verlauf eingestuft. Die Überlebensraten von Patienten, deren Therapieansprechen als nicht- CR dokumentiert wurde divergierten signifikant vom Verlauf der übrigen Patienten (s. Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Gesamtüberleben nach Therapieregime und -ansprechen.

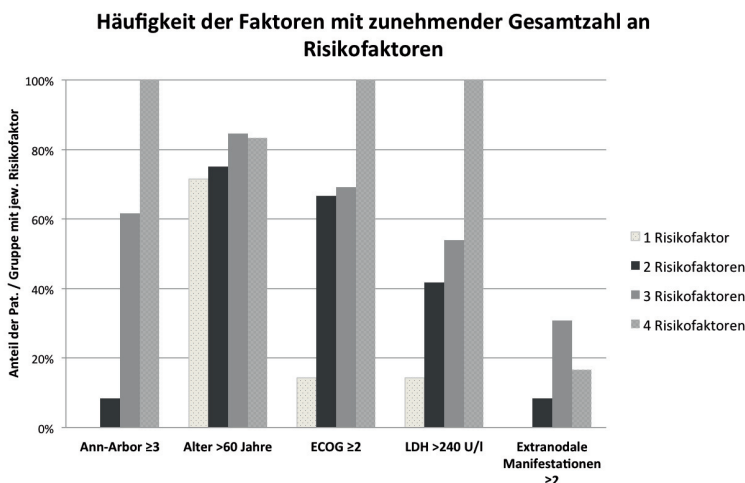
Tafel A bildet die Überlebensrate über einen Verlauf von 48 Monaten ab. Verglichen wurden die Verläufe von Patienten mit Standardtherapie und davon abweichender Therapie, wobei nicht zwischen R- CHOP 14 und -21 bzw. sonstigen Intervallvariationen des R-CHOP Regimes differenziert wurde. Tafel B kontrastiert die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten in kompletter Remission nach Therapie und Patienten die keine, bzw. keine komplette Remission erreichten. CR =komplette Remission, R- CHOP= Rituximab und Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison.

Unterschiede für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 48 Monaten zwischen den Geschlechtskategorien waren marginal und ohne Signifikanz (HR für weibliches Geschlecht: 1,16; 95% CI: 0,43 bis 3,16; p= 0,77). Das Vorliegen einer Anämie um den Diagnosezeitpunkt erwies sich retrospektiv als relevanter Parameter für eine ungünstige Prognose (HR: 4,4; 95% CI: 1,6 bis 12,4; p= 0,005).



### 3.3.2 Prognostik und Verlauf unter Aspekten des IPI

Die Prävalenz der einzelnen Risikofaktoren wird in Abb. 3.5 in Relation zur Gesamtzahl der Risikofaktoren gesetzt. Zwischen jenen Patienten mit einem und insgesamt zwei Risikofaktoren zeigte sich ein sprunghafter Anstieg der Prävalenz von LDH- Erhöhung und ECOG  $\geq 2$  von 14% auf 42% bzw. 14% auf 67%. Eine überproportional starke Zunahme gab es auch in der Häufigkeit von Ann- Arbor Stadium  $\geq 3$ , ECOG  $\geq 2$  und LDH- Erhöhung zwischen Patienten mit drei und vier IPI- Risikofaktoren. Der Anteil an Patienten mit mindestens zwei extranodalen Herden war unter Patienten mit insgesamt drei Risikofaktoren am höchsten (31% in dieser Gruppe) und verringerte sich unter Patienten mit vier Risikofaktoren auf 17%. Der Anteil der Über 60- Jährigen stieg hingegen mit der Zunahme der Gesamtzahl an Risikofaktoren nur mäßig von 73% bei einem Risikofaktor auf 83% unter Patienten mit vier Risikofaktoren an.



**Abb. 3.5:** Distribution der IPI- Risikofaktoren.

Häufigkeit der IPI- Risikofaktoren (Horizontale Achse) unter Patienten mit der jeweiligen Gesamtzahl an IPI- Risikofaktoren. Die vertikale Achse zeichnet den prozentualen Anteil an Patienten mit der jeweiligen Risikoausprägung unter allen Patienten der Subgruppe (Gesamtzahl der Risikofaktoren) ab. ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase.

Nach Stratifizierung der Patienten in vier Risikogruppen unter Einbeziehung des altersadaptierten IPI für Patienten jünger als 61 Jahre, zeigt sich folgende Verteilung: Die Niedrigrisiko Gruppe umfasste 11 Patienten, 14 Patienten wurden der Risikogruppe mit niedrig-intermediärem Risiko zugerechnet, 13 Patienten der Hoch-intermediär- und weitere

10 Patienten der Hochrisiko Gruppe. Im Gegensatz zu dieser tendenziell gleichförmigen Gruppenstärke, ergibt die Analyse der Vierjahresüberlebenswahrscheinlichkeit eine ungleichmäßige Aufteilung. Die exzellente Prognose der Niedrigrisikogruppe mit einem Vierjahresüberleben von 100% kontrastiert sich mit Überlebensraten von 64%, 56% und 31% in dieser Reihenfolge für Patienten mit hohem, niedrig-intermediärem und hoch-intermediärem Risiko. In den Risikokategorien niedrig, niedrig- intermediär, intermediär-hoch und hoch wurden 0, 6, 9 und 3 Todesfälle registriert.

Eine Zusammenfassung der Patientendistribution auf die IPI- Risikokategorien sowie die Prävalenz der Risikofaktoren je -Kategorie findet sich in Tab 3.3.

Die Spanne der Überlebensraten nach 4 Jahren reichte in diesen Subgruppen von 100% im Falle der Niedrigrisiko Patienten über 61% für jene mit hohem Risiko, 50% mit niedrig-intermediärem Risiko, bis zu 41% für die hoch-intermediäre Risikogruppe.

**Tabelle 3.3: Distribution der Patienten auf IPI- Risikogruppen -Risikofaktoren**

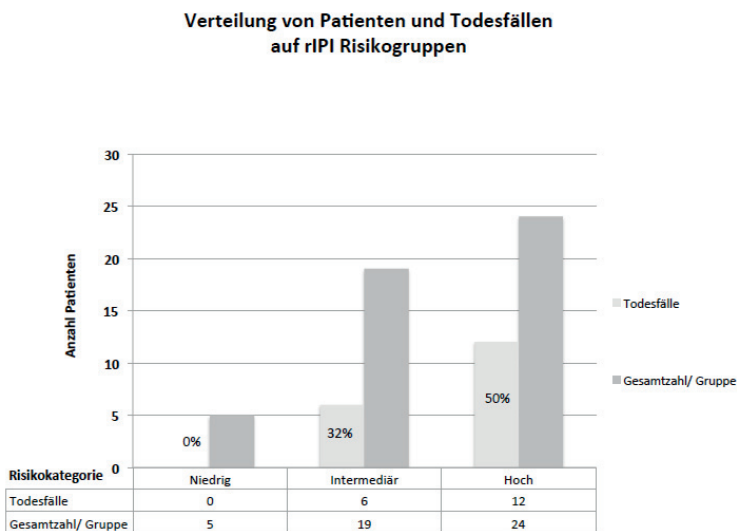
<b>IPI</b>	<b>Pat. n, (%)</b>	<b>ÜLR 48 Mo %</b>	<b>LDH &gt;Norm n,(%)</b>	<b>Ann- Arbor ≥3 n,(%)</b>	<b>ECOG ≥2 n,(%)</b>	<b>ENM ≥2 n,(%)</b>	<b>Alter &gt;60 %</b>
<b>(aa-) IPI</b>							
Niedrig	11 (23)	100	0	0	1 (9)	0	58
Niedrig-intermed	14 (29)	56	6 (43)	2 (14)	9 (64)	2 (14)	76,5
Hoch-intermed	13 (27)	31	8 (62)	8 (62)	9 (69)	4 (31)	67
Hoch	10 (21)	64	10(100)	10(100)	10(100)	5 (50)	71
<b>IPI</b>							
Niedrig	12 (25)	100	1 (8)	0	1 (8)	0	42
Niedrig-intermed	12 (25)	50	5 (42)	1 (8)	8 (67)	1 (8)	75
Hoch-intermed	13 (27)	36	7 (54)	8 (62)	9 (69)	4 (31)	85
Hoch	11 (23)	57	11(100)	11(100)	11(100)	6 (55)	91
<b>r- IPI</b>							
Sehr gut	5 (10)	100	0	0	0	0	0
Gut	19 (40)	68	6 (32)	1 (5)	9 (47)	1 (5)	74
Ungünstig	24 (50)	45	18 (75)	19 (79)	20 (83)	10 (42)	88

**Tab. 3.3:** Distribution der Patienten und Angabe der Prävalenz der Risikofaktoren absolut und in Relation zur Anzahl der Patienten je Risikogruppe. Angabe der Patientenzahl absolut und in Relation zum Gesamtkollektiv. Abk.: aaIPI= altersadaptierter IPI, ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, ENM= Extranodale Manifestationen, IPI= Internationaler Prognostischer Index, LDH= Laktat- Dehydrogenase, rIPI= revidierter IPI, ÜLR= Überlebensrate.

Die Stratifizierung anhand des nach Einführung der Rituximab- Therapie revidierten IPI unterteilt das Patientenkollektiv in 5 Patienten mit niedrigem, 19 mit niedrig-intermediärem und 24 Patienten mit hohem Risiko. Ebenso wie zuvor bereits der aaIPI zeigt auch diese Stratifizierung eine exzellente Überlebenswahrscheinlichkeit von 100% in der Niedrigrisiko Gruppe auf. Die Wahrscheinlichkeit 48 Monate zu überleben belief sich auf 68% in dem

Kollektiv mit niedrig-intermediärem Risiko und 45% für Patienten mit der ungünstigsten Risikokonstellation.

Beispielhaft wird am revidierten IPI in folgender Abbildung (Abb. 3.6) die Verteilung der Todesfälle auf die Risikogruppen und das Verhältnis zur Gesamtzahl der Patienten pro Gruppe dargestellt: Mit steigender Risikokategorie nahm sowohl die absolute als auch die relative Häufigkeit der Todesfälle zu. Während Patienten der Niedrigrisikogruppe eine Überlebensrate von 100% nach 48 Monaten erreichten, stieg die Anzahl der Todesfälle bei niedrig-intermediärem Risiko auf 6 und bei hohem Risiko auf 12 Fälle.

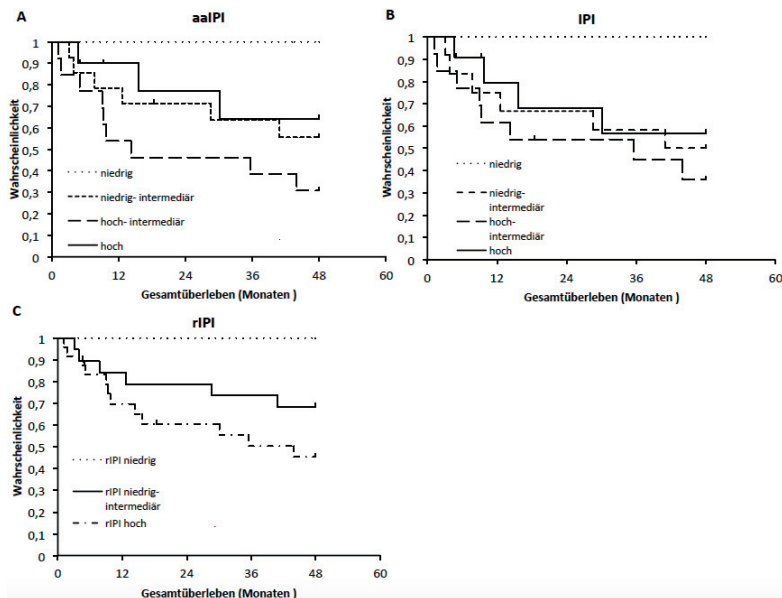


**Abb. 3.6:** Die Säulen beziehen sich auf die absolute Anzahl von Patienten und Todesfällen in den einzelnen Risikogruppen des revidierten IPI. Patienten ohne Risikofaktor werden als Niedrigrisiko, mit 1-2 Risikofaktoren als intermediär und mit  $\geq 3$  als Hochrisiko eingestuft. Prozentangaben bezeichnen den relativen Anteil verstorbener Patienten in der jeweiligen Risikogruppe.

Die in Tabelle 3.3 nicht erfasste Knochenmarksmanifestation zeigte in ihrem Auftreten eine deutliche Assoziation zu Hochrisiko Patienten: Der Knochenmarksbefall konnte in fünf Hochrisiko Patienten, hingegen in nur einem Patienten mit nicht-Hochrisiko- Einschätzung nach Standard- IPI detektiert werden. Die Zahlen bleiben auch nach Altersadaption identisch. Unter Anwendung des revidierten IPI verteilen sich die sechs Fälle mit nachgewiesener Knochenmarksinfiltration wie folgt: In der Niedrigrisiko Gruppe traten keine

Knochenmarksmanifestationen auf, unter Patienten mit niedrig-intermediärem Risiko ein Fall sowie fünf Fälle in der Hochrisiko Gruppe.

Abb. 3.7 zeigt den Verlauf der Überlebenswahrscheinlichkeit der Subgruppen innerhalb der ersten 48 Monate. Insgesamt ist die Divergenz der Kurven nach Standard- IPI etwas geringer als nach aa- IPI. Der r- IPI stratifizierte mit Vierjahres- Überlebenswahrscheinlichkeiten von 100, 69 und 45% in der sehr guten, guten und ungünstigen Risikokonstellation am eindeutigsten.

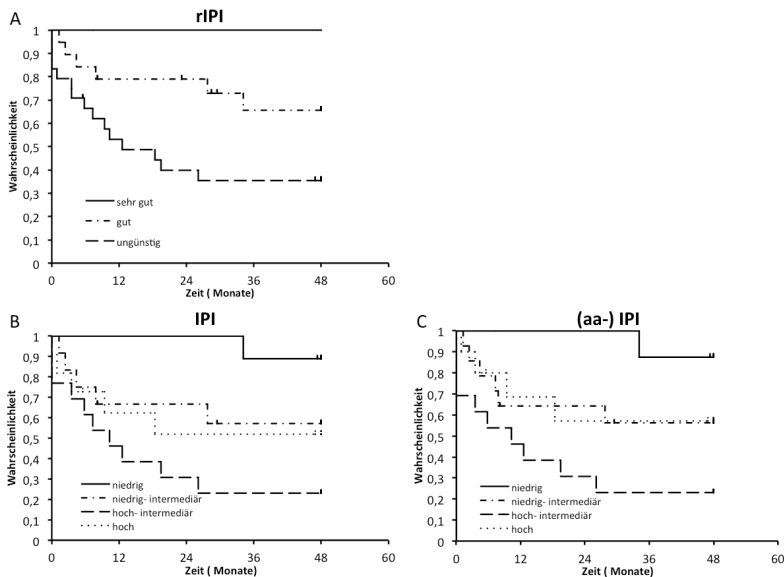


**Abb. 3.7:** Gesamtüberleben nach IPI- Gruppen

Kaplan- Meyer Kurven zeigen das Gesamtüberleben der Patienten nach Stratifizierung entlang unterschiedlicher IPI- Scores. *Tafel A* unterteilt in Gruppen des Standard- IPI. Bei Patienten jünger als 61 Jahre findet die altersadaptierte Erfassung von nun mehr drei Risikofaktoren Anwendung. *Tafel B* Überlebensraten der Risikogruppen ohne Altersadaption *Tafel C* Überlebensraten der Risikogruppen nach revidiertem IPI. IPI= Internationaler Prognostischer Index, aaIPI= altersadaptierter IPI, rIPI= revidierter IPI.

Im Hinblick auf das Progressionsfreie Überleben ergibt sich zum Analysezeitpunkt nach 48 Monaten eine im Vergleich zum Gesamtüberleben veränderte Reihenfolge der IPI- Subgruppen: Für die Patientengruppe mit Hochrisiko Konstellation sinkt die Wahrscheinlichkeit des progressionsfreien Überlebens hier zunächst unter die

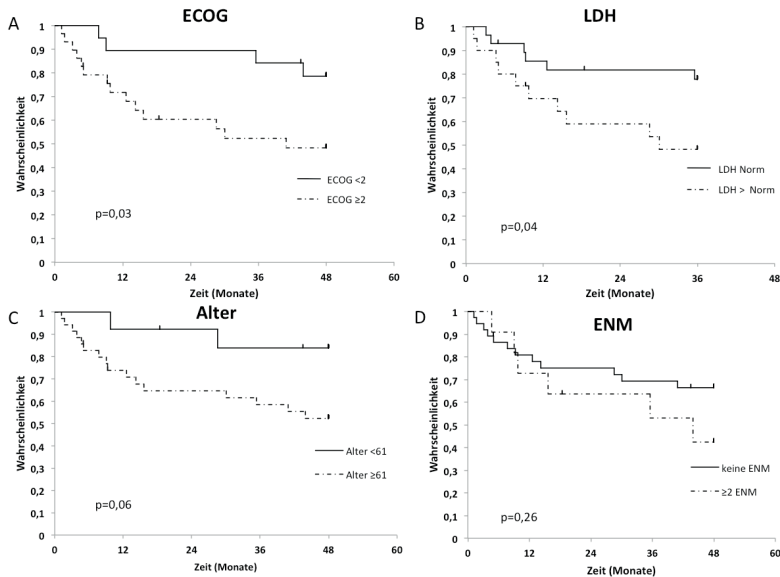
Wahrscheinlichkeit der niedrig-intermediären Risikokategorie. Im weiteren Beobachtungsverlauf ergibt sich allerdings die bereits für das Gesamtüberleben beschriebene Reihenfolge der Subgruppen. Genauere Verlaufsangaben zu den Analysezeitpunkten nach 48 Monaten finden sich in Tabelle 3.4 sowie in Abb. 3.7. In absoluten Zahlen belief sich die Anzahl der protokollierten Rezidive in den Niedrig-, Niedrig- intermediär, Intermediär- hoch und Hochrisikogruppen des (aa-)IPI auf 1, 3, 3 und 4 Fälle beziehungsweise auf 0, 3 und 8 Fälle in der Niedrig-, Intermediär- und Hochrisikokategorie des rIPI.



**Abb. 3.8:** Progressionsfreies Überleben in Patienten unterschiedlicher Risikokategorien. *Tafel A* Unterteilung nach revidiertem IPI *Tafel B* Gruppen nach Standard IPI *Tafel C* Gruppeneinteilung nach IPI bzw. altersadaptiertem IPI für Patienten <61 Jahre. IPI= Internationaler Prognostischer Index, aaIPI= altersadaptierter IPI, rIPI= revidierter IPI.

Als IPI- Risikofaktor mit statistischer Signifikanz stellten sich der Allgemeinzustand und LDH- Werte über Norm heraus. Patienten in tendenziell gutem Allgemeinzustand, also mit ECOG- Werten von 0 oder 1, hatten eine Vierjahres- Überlebensrate von 79%. Für ECOG- Werte >1 wurde eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 48% ermittelt (Hazard Ratio für Tod: 2,8; 95% CI: 1,1 bis 7,06;  $p=0,031$ ). Der Vergleich von Patienten mit normwertiger LDH zu >1-2x erhöhten LDH- Werten erwies sich die LDH- Erhöhung als prognostisch signifikant (Dreijahres- ÜLR 78 vs. 48%;  $p=0,039$ ).

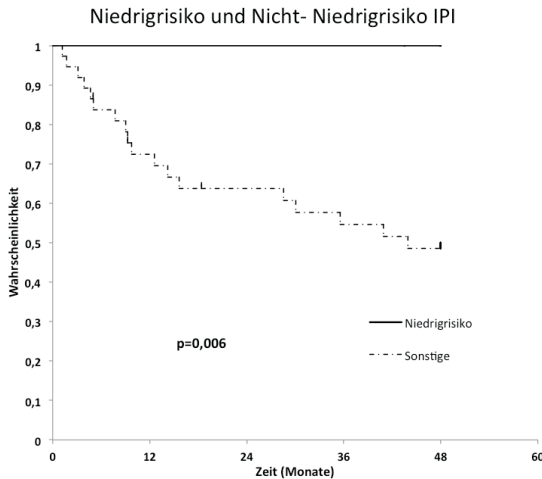
Alter >60 Jahre und mindestens zwei extranodale Manifestationen zeigen im Vergleich zur Norm geringere Überlebensraten, allerdings ohne statistische Signifikanz. Die Überlebensraten von Patienten in fortgeschrittenem und lokalisiertem Krankheitsstadium unterschieden sich nur unwesentlich.



**Abb. 3.9:** Gesamtüberleben nach IPI- Risikofaktoren

*Tafel A* ECOG ≥2 (= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score), *Tafel B* LDH über Norm (= Laktat- Dehydrogenase ), *Tafel C* ≥2 ENM (= Extranodale Manifestationen), *Tafel D* Alter >60 Jahre

Im Wesentlichen kontrastiert sich in der Analyse der IPI- Risikogruppen also eine kleine, prognostisch exzellente Niedrigrisiko Gruppe von den ungünstiger verlaufenden Gruppen mit niedrig- intermediärem bis hohem Risiko. Patienten mit hoch-intermediärem Risiko hatten hierunter die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit ohne sich dabei signifikant von den niedrig-intermediären beziehungsweise Hochrisiko Scores abzugrenzen. Der Vergleich der Niedrigrisiko Gruppe mit dem übrigen Patientenkollektiv identifiziert hingegen zwei Gruppen mit signifikant unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten (HR für Tod bei Nicht-Niedrigrisiko: 4,2; 95% CI: 1,5 bis 11,6;  $p=0,006$ ).



**Abb. 3.10:** Überlebensrate über 48 Monate von Patienten mit Niedrigrisiko IPI vs. Patienten der Risikogruppen niedrig-intermediär bis Hochrisiko. Für Patienten <61 Jahre wurden analog des aaIPI nur die Faktoren LDH, ECOG und Ann- Arbor Stadium gewertet.

Die in dieser retrospektiven Analyse durch den IPI nur unzureichend stratifizierte Gruppe der Patienten mit mehr als einem IPI- Risikofaktor konnte auch unter Einbeziehung weiterer Risikofaktoren wie Knochenmarkbefall, Vorliegen von B- Symptomen oder mediastinaler Tumorkonglomerate und Alter  $\geq 65$  Jahre nicht weiter diversifiziert werden. Lediglich eine partielle Remission oder ein fehlendes Therapieansprechen galten auch für Patienten mit Nicht- Niedrigrisiko IPI als signifikante Größe für eine ungünstigere Überlebenswahrscheinlichkeit.

Analog zum altersadaptierten IPI stratifiziert der rIPI gleichermaßen in jene Patienten mit niedrigem Score und sehr guter Überlebensrate und zwei unterlegene Gruppen mit intermediärem beziehungsweise hohem Risiko. Obschon letztere sich deutlicher trennen als unter Anwendung des aaIPI, ist die Differenz zwischen intermediärem und hohem Risiko nicht signifikant (HR für Tod bei hohem im Vergleich zu intermediärem Risiko: 1,93; 95% CI: 0,76 bis 4,89;  $p=0,16$ ). Die Überlebensraten der prognostisch sehr guten r- IPI Kategorie und die der ungünstigen Kategorie unterschieden sich indessen signifikant ( $p=0,048$ ).

Zum Vergleich der IPI- Risikofaktoren wurde deren gegenseitiger Einfluss mithilfe des Pearson Chi- Quadrat Tests untersucht. Erhöhungen der LDH wurden mit signifikanter Häufung unter Patienten mit ECOG- Punktwert  $\geq 2$  gefunden. Keine signifikante Korrelation besteht hingegen zwischen LDH- Level und Patientenalter oder der Anzahl extranodaler Manifestationen. Unter Patienten mit erhöhtem ECOG- Wert, also reduziertem



Allgemeinzustand konnte signifikant häufiger eine Anämie festgestellt werden als unter Patienten in normalem oder leicht- reduziertem Allgemeinzustand.

**Tabelle 3.4 Zusammenhangsgrad der IPI- Faktoren**

Korrelation	p- Wert	Korrelation	p- Wert
LDH- ECOG	<b>0,008</b>	ECOG- Alter	0,22
LDH- Ann Arbor	0,08	ECOG- Anämie	<b>0,015</b>
LDH- Alter	0,75	ECOG- Extranodale Herde	0,80
LDH- Extranodale Herde	0,73	Alter- Ann Arbor	0,35

**Tab. 3.4:** Chi- Quadrat Analyse des Zusammenhangs der IPI- Faktoren. Verglichen wurden Kategorien analog der Aufteilung des IPI-Score. Alle Werte wurden als zweiseitigen Tests errechnet. P- Werte unterhalb des Signifikanzniveaus von  $\alpha=0,05$  sind fettgedruckt. ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase.

### 3.3.3 Prognostik und Verlauf unter Aspekten der Immunhistochemie

Die Gegenüberstellung der erhobenen Proteinexpression mit klinischen beziehungsweise laborchemischen Parametern zeigte keine signifikanten Zusammenhänge. Einzige Ausnahme blieb die negative Korrelation der Bcl- 6 Proteinexpression mit erhöhten LDH- Spiegeln ( $p=0,03$ ; s. Tab.3.5).

**Tabelle 3.5 Assoziation von Risikofaktoren und Proteinexpression**

Variable	B- Sympt.	IPI $\geq 2$	LDH- Erhöht	Alter $\geq 61$	Ann Arbor III/IV	ECOG $\geq 2$	Extranod. - Herde $\geq 2$
<b>Bcl- 2</b>	$p=0,31$	$p=0,84$	$p=0,54$	$p=0,82$	$p=0,84$	$p=0,42$	$p=0,81$
<b>CD10</b>	$p=0,20$	$p=0,72$	$p=0,56$	$p=0,45$	$p=0,76$	$p=0,6$	$p=0,93$
<b>Bcl- 6</b>	$p=0,41$	$p=0,35$	<b><math>p=0,03</math></b>	$p=0,72$	$p=0,68$	$p=0,14$	$p=0,72$
<b>MUM-1</b>	$p=0,30$	$p=0,62$	$p=0,14$	$p=0,27$	$p=0,30$	$p=0,19$	$p=0,24$

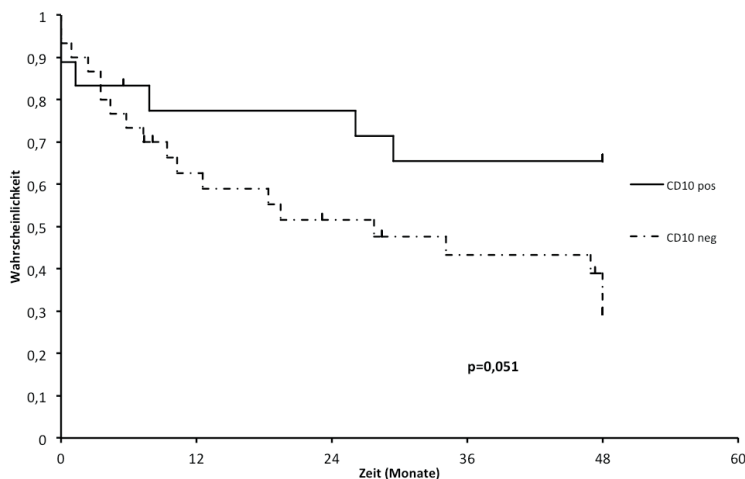
**Tab. 3.5:** Chi- Quadrat Analyse der Häufung von klinischen Risikofaktoren im Bezug auf Proteinexpressionsmuster. Alle Werte wurden als zweiseitigen Tests errechnet. P- Werte unterhalb des Signifikanzniveaus von  $\alpha=0,05$  sind fettgedruckt. ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase, IPI= Internationaler Prognostischer Index.

Keines der in Keimzentrum- oder Aktivierten- B- Zellymphomen charakteristischerweise exprimierten Proteine konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit als eigenständige

Einflussgröße zuverlässig vorhersagen. Es fanden sich allerdings Tendenzen: So neigten die für die Keimzentrumsmarker CD10 und bcl-6 positiven Lymphome zu einem günstigeren Krankheitsverlauf. MUM-1, dessen Expression mit Aktivierten B-Zellen verbunden wird, diskriminierte im Verlauf der Überlebensraten hingegen kaum zwischen den dafür positiven und negativen Lymphomen. Unter Patienten mit CD10- positiven Lymphomen verstarben bis zum Zeitpunkt der Datenauswertung 6/18 Patienten. Unter den CD10- negativen Lymphomen trat das gleiche Ereignis in 12/30 Fällen ein. Der tendenziell günstigere Verlauf der CD10 positiven Lymphome erreichte jedoch keine signifikanten Unterschiede (HR für Tod CD10 neg./pos.: 1,28; 95% CI: 0,5 bis 3,3; p= 0,61).

Innerhalb der Gruppe der Bcl- 6 positiven beziehungsweise negativen Patienten verstarben in den 48 Monaten nach Diagnose 12/32 und 5/11 Patienten respektive. Die Differenz in den Überlebenswahrscheinlichkeiten übersetzte sich auch bei diesem Keimzentrumsmarker nicht in einen signifikanten Unterschied (HR Bcl6 neg./pos.: 1,45; 95% CI: 0,47 bis 4,48; p=0,52). Die Kaplan- Meyer Überlebenskurven für MUM1 markierten sehr ähnliche Verläufe, wobei Patienten mit MUM1 negativen Lymphomen mit <2% eine marginal höhere Überlebensrate hatten (HR MUM1neg./pos.: 1,14; 95% CI: 0,37 bis 3,49; p=0,81).

Die Betrachtung des kombinierten Endpunktes „Progressionsfreies Überleben“ unter Aspekten der CD10- Expression ergab ein klareres Bild: Unter den CD10 positiven Lymphomen traten Rezidive mit 2/18 im Vergleich zu 9/30 bei CD10- negativen Patienten deutlich seltener auf. Das progressionsfreie Überleben der CD10- positiven Lymphome ist dem des CD10- negativen Phänotyps tendenziell überlegen (s. Abb. 3.11). Ebenso unterschied sich die Anzahl der zensierten Ereignisse: innerhalb dieser 48 Monate wurden 1/18 Patienten in der CD10 positiven- und 4 von 30 Verläufen in der CD10 -negativen Kategorie zensiert.



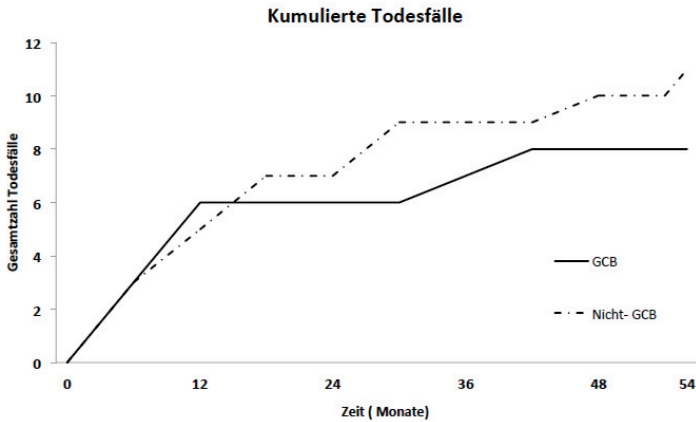
**Abb. 3.11:** Progressionsfreies Überleben nach CD10- Phänotyp. Dargestellt ist der Verlauf von Patienten mit CD10- positiven -negativen Lymphomen über vier Jahre.

Anders als zuvor in der Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit ereignete sich der kombinierte Endpunkt aus Tod oder Progress in 12/25 vs. 8/12 Fällen relativ häufiger unter den MUM1 negativen Lymphomen. Der Verlauf des progressionsfreien Überlebens zwischen beiden MUM1- Phänotypen variierte jedoch nur marginal.

Auch für Bcl- 6 konnten in der Kaplan- Meyer- Analyse des progressionsfreien Überlebens keine signifikanten Unterschiede oder Tendenzen registriert werden ( $p=0,69$ ).

Bcl- 2 Positivität erwies sich in der Analyse des Gesamtüberlebens als günstiger (HR für Tod Bcl2 neg./pos.: 1,44; 95% CI: 0,53 bis 3,9;  $p=0,48$ ).

Eine Übersicht über das Verhältnis der nach dem Hans- Algorithmus ermittelten GCB und non-GCB Lymphome zu klinischen Parametern wurde bereits im Abschnitt 3.2.2 „Immunhistochemie“ gegeben. Die Homogenitätsanalyse zwischen beiden Gruppen konnte keine signifikante Häufung eines IPI- Risikofaktors oder eines anderen gängigen Risikofaktors auf Seiten der Keimzentrums- oder Aktivierten B-Zell Lymphome detektieren. Über den erhobenen Verlauf von vier Jahren verstarben unter den nach Hans klassifizierten Patienten mit Keimzentrumshistologie 8/23 (35 %) Patienten. In der Gruppe der gegenübergestellten Nicht- Keimzentrumslymphome verstarben 10/25 (40 %) Patienten. In der Folge verstarben unter den Nicht- Keimzentrumslymphomen weitere drei Patienten (Gesamt 13/25, 52 %) bis 77 Monate nach Diagnosestellung. Die ermittelte Anzahl an Todesfällen unter den GCB- Patienten blieb hingegen über diese Zeitspanne konstant.



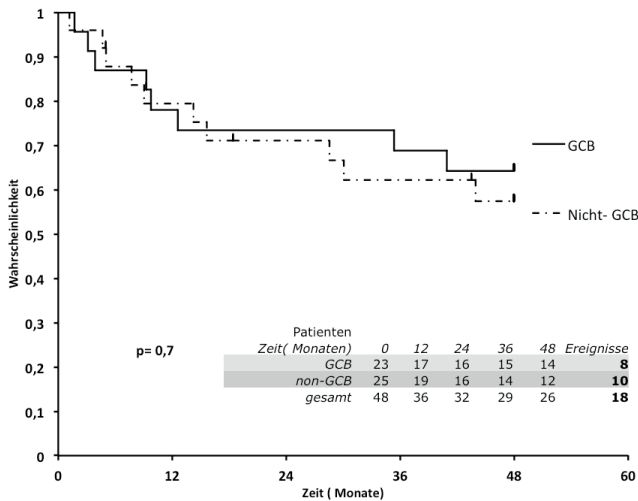
**Abb. 3.12:** Kumulierte Häufigkeit von Todesfällen in Patienten mit GCB vs. Nicht- GCB Lymphomen. Die Häufigkeit wird hier im Intervall von 6 Monaten dargestellt. GCB= Keimzentrums- B- Zell Lymphom.

Unter Einbezug der zensierten Ereignisse ergibt sich folgendes Bild:

In der Kohorte der Keimzentrumslymphome verbleiben nach 48 Monaten 14 von initial 23 Patienten, wobei 8 Todesfälle und ein wegen unzureichender Datenlage zensiertes Ereignis registriert wurden. Unter den Nicht- Keimzentrumssubtypen wurden in vier Jahren drei Zensuren und 10 Todesfälle registriert, sodass hier bei 12 Patienten das Vierjahres Überleben bestätigt werden konnte. Innerhalb der folgenden 48 Monate verstarben unter den Nicht-Keimzentrumslymphomen weitere drei Patienten.

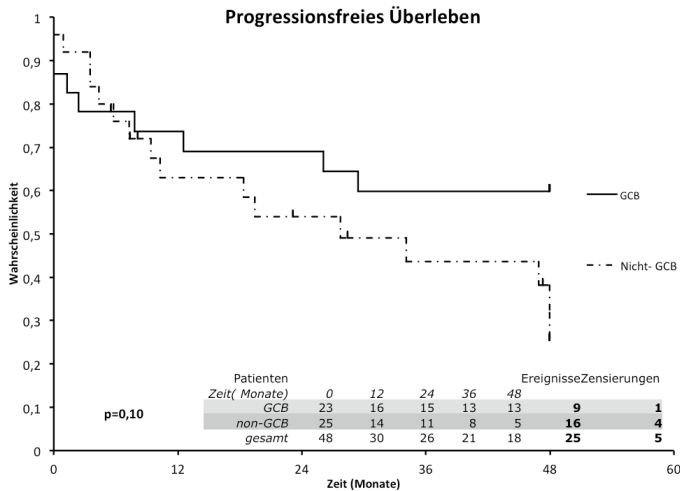
Die Kaplan- Meyer- Schätzung der Überlebensraten zeichnet für GCB und non- GCB Lymphome insbesondere während der ersten 15 Monate sehr ähnliche Schätzwerte, die erst im weiteren Verlauf divergieren. So lag die mediane Überlebensrate in letzterer Gruppe bei 54 Monaten, während sie unter den Keimzentrumslymphomen nicht erreicht wurde. Obschon sich eine leicht überlegene Überlebensrate in der GCB- Gruppe abzeichnet, ließ sich nach 48 Monaten kein signifikanter Unterschied belegen (s. Abb. 3.13).

### Gesamtüberleben nach Hans- Algorithmus



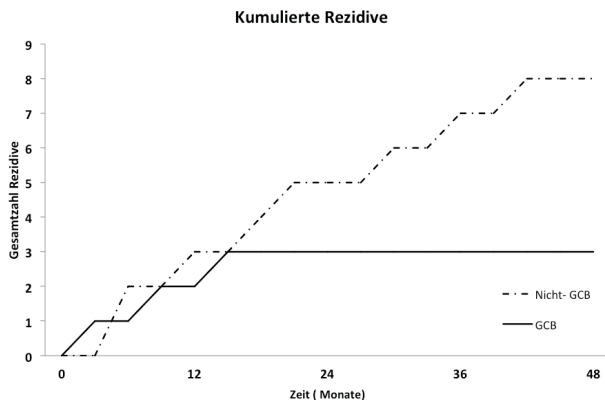
**Abb. 3.13:** Überlebensrate über 48 Monate GCB vs. Nicht- GCB Lymphome. Die Tabelle zeigt die Patientenzahl je Gruppe sowie die Gesamtzahl im zeitlichen Verlauf. Fettgedruckt: Kumulierte Häufigkeit der Todesfälle in jeder Gruppe bzw. aller Patienten. GCB= Keimzentrums- B- Zell Lymphom.

Die Verteilung der registrierten Rezidive bis vier Jahre nach Therapiebeginn zwischen GCB und nicht- GCB Patienten weist ein ähnliches Muster der oben beschriebenen Unterteilung nach CD10- Positivität auf. Gegenüber 3/23 (13 %) Patienten mit Keimzentrumslymphomen rezidierten unter den Patienten mit nicht- GCB- Lymphomen 8/25 (32 %). Tod bzw. Progress wurden in 9/23 GCB- und 16/25 Non- GCB- Patienten dokumentiert. In der Kaplan-Meyer- Schätzung des PFS zeigt sich eine Differenz von 33% zwischen den errechneten Ereignisraten beider Gruppen. Diese Divergenz entspricht einem deutlich, wenn auch nicht signifikantem Trend für ein günstiger PFS in der GCB- Gruppe unserer Analyse (s. Abb. 3.14).



**Abb. 3.14:** Kaplan- Meyer Plot des Progressionsfreien Überlebens von GCB vs. Nicht- GCB Lymphomen. Tabellarisch erfasst sind Patientenzahl / Gruppe im Verlauf sowie kumulierte Häufigkeit von Rezidiven und zensierten Verläufen über 48 Monate. GCB= Keimzentrums- B- Zell Lymphom.

Im Kontrast zu der zu der ähnlichen Inzidenz der Todesfälle unter den Lymphomsubtypen, zeigt die Häufigkeit der Rezidive eine größere Divergenz, wie in Abbildung 3.15 illustriert. Keimzentrumslymphome rezidierten in dieser Analyse bis zum 13. Monat nach Therapiebeginn. Unter den Nicht- Keimzentrumslymphomen traten 5/8 (63 %) Rezidive innerhalb der ersten zwei Jahre auf. Die übrigen Rezidive (37 %) folgten vor Ablauf des vierten Jahres nach Therapie.



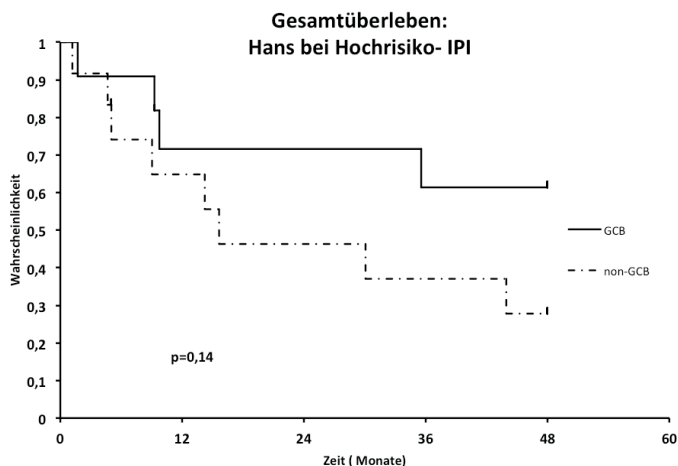
**Abb. 3.15:** Kumulierte Häufigkeit der Rezidive unter Patienten mit GCB vs. Nicht- GCB Lymphomen. Die Häufigkeit wird im Intervall von 6 Monaten erfasst. GCB= Keimzentrums- B- Zell Lymphom.

Im Folgenden wird auf die Evaluierung der Stratifizierung nach Hans in besonderen Patientengruppen, beziehungsweise bei Vorliegen oder Fehlen bestimmter Risikofaktoren, eingegangen. Es wurde jeweils die Aussagekraft des Algorithmus für Patienten mit IPI- Score  $\geq 3$  oder Positivität für einzelne IPI- Risikofaktoren, Patienten älter als 60 Jahre sowie männliche oder weibliche Patienten untersucht.

Wird ein Trennwert von mehr als drei IPI- Risikofaktoren zugrunde gelegt, fallen 23 Patienten in diese Gruppe. Die prognostische Aussage des Hans- Algorithmus ist in Patienten mit  $<3$  Risikofaktoren und  $\geq 3$  Risikofaktoren heterogen: In jener Gruppe mit  $\geq 3$  IPI- Risikofaktoren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit GCB Lymphomen tendenziell höhere Überlebensraten hatten als solche mit Nicht- GCB Lymphomen. Die mediane Überlebensrate betrug für Patienten mit  $\geq 3$  IPI- Faktoren und Non- GCB Subtyp 15,6 Monate. In der GCB Gruppe wurde das mediane Überleben nicht erreicht (HR Non- GCB /GCB 2,4;95%- CI: 0,75-7,35;  $p=0,14$ ; s. Abb. 3.16).

Hierzu kontrastiert sich allerdings die prognostische Aussage des Algorithmus für niedrige IPI- Werte ( $<3$ ), da hier die Überlebenswahrscheinlichkeit über vier Jahre bei Nicht- GCB Histologie überlegen war (83% versus 67% Nicht-GCB / GCB Lymphome; Median jeweils nicht erreicht;  $p=0,34$ ).

Genauer betrachtet stellte sich die prognostische Relevanz des Hans- Algorithmus in unserer Evaluation demnach insbesondere in der Hochrisikokategorie mit  $\geq 3$  Risikofaktoren heraus. In der Hochrisiko Gruppe (4- 5 Risikofaktoren) verstarb kein Patient mit GCB- Histologie. Indessen wurden unter Non- GCB Patienten über 48 Monate 8 Todesfälle registriert.



**Abb. 3.16:** Gesamtüberleben nach Hans- Algorithmus in Hochrisikopatienten.

Der Kaplan- Meyer Plot vergleicht die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit GCB vs. Nicht- GCB Lymphomen. Die Analyse bezieht sich auf Patienten mit Hochintermediärem- und Hochrisiko IPI. GCB = Keimzentrums- B- Zell Lymphom.

In der 20 Patienten zählenden Auswahl mit Ann- Arbor Stadium  $\geq 3$  wurde für Keimzentrumslymphome eine deutlich günstigere Prognose ermittelt: Nicht-GCB Lymphome erreichten ein medianes Überleben von 30,1 Monaten, während das mediane Überleben in der Gegengruppe der GCB Lymphome nicht erreicht wurde. Die absolute Differenz zwischen den Vierjahres- Überlebensraten betrug 39 % (HR nicht- GCB/ GCB 3,1; 95% CI: 0,73 bis 13,24;  $p=0,125$ ). Diese prognostische Differenz konnte andererseits unter Patienten in lokalisierten Krankheitsstadien nicht bestätigt werden.

Gleiche Konstellation galt für die Evaluation unter Aspekten einer erhöhten oder normwertigen LDH. Wiederrum erwies sich die GCB- Histologie bei Vorhandensein des Risikofaktors, also erhöhter LDH, als den Nicht- GCB Lymphomen mit einer Vierjahres- Überlebenswahrscheinlichkeit von 79% zu 37% als überlegen, bei normwertiger LDH hingegen mit einer Überlebensrate von 54 % zu 80% als unterlegen. Die mediane Überlebensrate wurde in beiden Gruppen bei normwerter LDH nicht erreicht ( $p=0,16$ ). Bei erhöhten LDH- Werten belief sich das mediane Überleben auf 28,6 Monate in Non- GCB Lymphomen bzw. wurde in GCB Lymphomen nicht erreicht (HR bei erhöhter LDH Nicht- GCB/ GCB: 2,86; 95% CI: 0,822 bis 9,96;  $p=0,09$ ).



Auch die Anwendung des Hans- Algorithmus unter Selektion von Patienten mit mindestens zwei extranodalen Lymphomherden weist die Überlebensrate der GCB- Patienten als überlegen aus, ohne dass dieser Vorteil mit ausreichender Sicherheit statistisch belegt werden konnte (Mediane Überlebenswahrscheinlichkeit nicht erreicht vs. 15,6 Mo. für GCB und nicht- GCB;  $p=0,29$ ).

Eine Auftrennung der Patientenauswahl nach ECOG Allgemeinzustand  $\geq 2$  oder die Unterteilung in Patienten  $\geq 61$  oder  $< 60$  Jahre erlaubte keine weitere Stratifizierung durch den Hans- Algorithmus ( $p=0,9$  für  $\text{ECOG} \geq 2$ ;  $p=0,91$  und  $p=0,85$  für Alter  $< 61$  bzw.  $\geq 61$  Jahre). Zusammenfassend ging eine GCB- Einstufung also bei Vorliegen der IPI Risikofaktoren Ann Arbor Stadium  $\geq 3$ , erhöhten LDH- Werten und mindestens zwei extranodalen Herden mit höheren Überlebensraten als eine Nicht- Keimzentrumseinstufung einher. Im Umkehrschluss erreichten Nicht- GCB Patienten noch am ehesten bei normalem LDH- Level eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als die GCB- Gruppe, wenngleich auch keine der aufgeführten Tendenzen als statistisch signifikant eingestuft werden konnte.

Die Unterteilung nach Geschlechtskategorien erbrachte keinen Zugewinn für die Stratifizierung nach Hans- Algorithmus. Weder unter männlichen unter noch weiblichen Patienten hatte einer der Hans- Subtypen einen signifikant abweichenden Verlauf.

Für 10/23 Patienten mit GCB Lymphomen und 9/25 mit Nicht- GCB Subtyp wurden B- Symptome dokumentiert. Unter Patienten mit B- Symptomatik wurde nach deren Subklassifizierung nach dem Hans- Algorithmus für beide Gruppen eine ähnliche Anzahl von drei Todesfällen in der GCB- (3/10; 4- Jahres ÜLR 68%) und vier Todesfällen in der Nicht- GCB- Gruppe (4/9; 4- Jahres ÜLR 50%) gefunden. Die mediane Überlebensrate wurde in letzterer Gruppe nach 30,1 Monaten erreicht (Bei B-Symptomen und GCB nicht erreicht;  $p=0,64$ ).

## **4. Diskussion**

In diese retrospektive Studie wurden 48 Patienten einbezogen, die sich zwischen 2007 und 2011 mit Diffus Großzelligem B- Zelllymphom am Uniklinikum Giessen in Behandlung befanden. Zielsetzung war die Überprüfung der prognostischen Relevanz zweier Methoden

der Risikostratifizierung nach Einführung der Immuntherapie: Zum einen, der auf klinisch-, laborchemischen Kriterien fußende Internationale Prognostische Index, zum anderen der von Hans et al. etablierte, auf Immunhistochemie basierende Hans- Algorithmus.

1993 wurde von Shipp et al. der IPI zur prognostischen Unterteilung der sonst heterogen verlaufenden DLBCL publiziert. Diese Klassifikation teilte Patienten vier Risikokategorien mit 5- Jahres- Überlebensraten von 26- 73% zu (53). Nach Etablierung der Immuntherapie als therapeutisches Standbein neben dem Standard CHOP Schema wurde der Stellenwert des IPI mehrfach geprüft. Die Autoren kamen in diesen Studien zu uneinheitlichen, teils widersprüchlichen Schlussfolgerungen über die Relevanz des IPI in der Rituximab- Ära (52, 54, 55, 57, 98-101).

Gleichmaßen wurde auch die von der Ursprungszelle ausgehende Stratifizierung in Keimzentrums- und Nichtkeimzentrums- Subtypen in der Prä- Rituximab- Ära begründet (10, 15, 16, 58). Mithilfe von zwei keimzentrumstypischen Antigenen und einem Plasmazell- Antigen konnten durch den sogenannten Hans- Algorithmus prognostisch divergierende Patientengruppen identifiziert werden (66). Infolge der Addition der Immuntherapie wurde die Aussagekraft des Hans- Algorithmus kontrovers diskutiert, mit Autoren, die sich für (61, 65, 69, 71) oder gegen (51, 64, 67, 72, 73, 75) die Relevanz des IHC- Algorithmus aussprachen.

In dieser Arbeit sollte also retrospektiv die Prognoseeinschätzung analog oben genannter Methoden nun mehr für am Standort Giessen des Uniklinikums Giessen und Marburg therapierte Patienten untersucht werden.

#### 4.1 Epidemiologie

Das Geschlechtsverhältnis in NHL zeigt je nach Subtyp in variierender Ausprägung eine männliche Prädominanz(5). Für das DLBCL wurden Inzidenzen im Verhältnis von 1,1- 1,5:1 (m:w) beschrieben(1, 2, 7, 84). Unter den 48 in diese Analyse eingeschlossenen Patienten fanden sich indessen im Verhältnis von 1,4:1 mehr Frauen als Männer. Diese, zur Literatur inverse Konstellation ist am ehesten Zufall bei einem insgesamt geringen Patientenkollektiv.

Der Altersmedian von Patienten mit dieser Lymphomerkrankung lag in diversen Publikationen bei etwa 60– 61 Jahren (52-55, 90, 98, 100). In unserer Untersuchung lag

das mediane Patientenalter bei 67,5 Jahren. Die Über- 60- Jährigen stellten nach Maßstab obiger Studien einen überdurchschnittlich großen Anteil von 73%. Patienten mit GCB- Subtyp sind mit einem Altersmedian von 61 im Vergleich zu 66 Jahren eher jünger als Nicht- GCB Patienten und haben dazu korrespondierend mit ca. 48% auch einen geringeren Anteil an Patienten über 60 Jahre unter den Non-GCB Lymphomen (25, 58, 90). Die, auf die Subtypen bezogen, gefundenen Altersunterschiede zeigten sich in unserer retrospektiven Analyse weniger ausgeprägt: Zwar war der Anteil der Patienten älter als 60 Jahre, analog zu den Beobachtungen obiger Autoren, in der GCB- Gruppe mit 46% zu 54% geringer als in der Nicht- GCB Kategorie, doch überstieg der Altersmedian der GCB- Patienten mit 69 Jahren den der Nicht- GCB Patienten mit 67 Jahren. Die Abweichung des Altersmedian der GCB- Kategorie von denen in anderen Publikationen beschriebenen Werten ist angesichts der ähnlichen Proportion von Patient  $\geq 61$  Jahre am ehesten auf das im Speziellen unter den Über- 60 Jährigen GCB- Patienten sowie allgemein im Gesamtkollektiv höhere Alter zurückzuführen.

48% der in diese Analyse eingeschlossenen Patienten wurden analog dem Hans Algorithmus dem GCB- Subtyp zugeordnet, 52% als Nicht- GCB klassifiziert. Diese Proportion entspricht in etwa den Beobachtungen anderer auf diesem IHC- Algorithmus basierender Analysen, die die Inzidenz der Subtypen in gleichen Zahlen beziehungsweise mit leichtem Überhang zum Nicht- GCB Typ detektierten (59, 65-67, 69). Mit Hilfe von Gen Expression Profilen lassen sich drei Subtypen unterscheiden. Rosenwald et al. und Hans et al. kategorisierten auf diese Art schätzungsweise 20% der Patienten als nicht klassifizierbar, 50% als GCB- und 30% als ABC- Typ(58, 66). Mareschal publizierten Daten, die die Progression der ABC- Proportion mit dem Altersschnitt der jeweiligen Patiengruppe belegen. In der Kohorte der 50- 60 Jährigen wurde der ABC- Typ in 28-33% der Lymphome detektiert, unter den Über- 80 Jährigen in 67% der Fälle. Die Autoren schätzten die durchschnittliche Progression des ABC- Anteils auf etwa 8-14% pro Altersdekade(102). Der in unserer Analyse nach Hans ermittelte Anteil der Nicht- GCB Lymphome überstieg mit 52% geringfügig die nach Mareschal et al. zu erwartenden 47%, umfasst allerdings neben den ABC- auch die in den GEP- Analysen als Typ 3 klassifizierten Lymphome.

Neben den 42 DLBCL- NOS wurden sechs Großzellige B- Zell Lymphome aus drei anatomisch beziehungsweise pathologisch näher spezifizierten Kategorien in diese Studie mit eingebunden: Primäre ZNS- Lymphome, primär kutane DLBCL und ein

Grauzonenlymphom. Gemessen an den publizierten Inzidenzraten dieser Entitäten und ihrem Anteil von jeweils weniger als 1% der NHL(103, 104), konstituieren diese drei Lymphom Typen mit ca. 13% der von uns untersuchten Fälle einen überproportional großen Anteil.

## 4.2 Therapie und Verlauf

### **4.2.1 Verlauf**

Die Überlebenswahrscheinlichkeit über vier Jahre wurde in unserer Analyse auf 61% geschätzt. Etwa drei Viertel der Todesfälle wurden in den ersten zwei Jahren nach Therapiebeginn registriert. Für Patienten aller Altersgruppen, die wie in unserer Studie mit R- CHOP behandelt wurden, berichteten unter anderem Sehn et al. und Bari et al. von Überlebensraten um 70% (54, 98). Coiffier et al. untersuchten die Langzeitüberlebensraten unter Chemo- Immuntherapie unter 60- 80 jährigen Patienten. Auch in diesem Kollektiv lag die Überlebenswahrscheinlichkeit nach vier Jahren bei ca. 60% (85). Ebenso wie die Überlebensraten in oben genannter Zeitspanne korreliert auch das zeitliche Auftreten der Todesfälle in unserer Patientengruppe mit den Beobachtungen anderer Autoren. So zeigte sich in diesen Studien der markanteste Abfall der Überlebensrate auf etwa 75% innerhalb der ersten 24 Monate nach Therapiebeginn (54, 84, 98). Der Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeit vor und nach Einführung von Rituximab von Sehn et al. aus dem Jahr 2005 belegte ferner, dass sich trotz der Verbesserung im Gesamtüberleben die Kinetik dieser Überlebenskurve in der post- Rituximab Ära nicht wesentlich geändert hat(84).

Aufgrund des ähnlichen Verlaufs der Schätzungen für Progressionsfreies- und Gesamtüberleben schlossen Bari et al., dass die Rezidivtherapie im Vergleich zur Erstlinie R- CHOP nur einen untergeordneten Einfluss auf das Gesamtüberleben hat(98). Analog dazu lag das von einigen Autoren publizierte durchschnittliche PFS nach vier Jahren bei schätzungsweise 70% (54, 75). Récher et al. berichteten ein ähnliches PFS für jüngere, Niedrigrisiko Patienten, Delarue et al. hingegen ca. 60% nach R- CHOP Therapie unter 60- 80- jähriger Patienten(105, 106). Kongruent zur Inzidenz der Todesfälle fiel auch der überwiegende Anteil der Rezidive in diesen Arbeiten auf die ersten zwei Jahre nach Therapiebeginn.

In unserer retrospektiven Auswertung konnten wir in 23% der Fälle Rezidive registrieren. Die Hälfte dieser Rezidive trat innerhalb der ersten 15 Monate, 73% in den ersten 24 Monaten nach Therapiebeginn auf. Das Progressionsfreie Überleben wurde auf 79% nach 24 Monaten bzw. auf 69% nach 48 Monaten geschätzt und liegt somit im Bereich zuvor erwähnter publizierter Daten.

#### **4.2.2 Therapie**

Das R-CHOP Protokoll bleibt etablierter Standard im Zeitalter der Immuntherapie. Der Nutzen der Rituximab- Addition wurde erstmalig für Patienten  $\geq 60$  Jahre von Coiffier et al. im Jahr 2002 erbracht (85, 86). Die RICOVER- 60 Studie in der gleichen Alterskohorte unterstützte diese Ergebnisse. Zusätzliche Therapiezyklen zu 6x R- CHOP brachten hier keinen Vorteil (107). Pfreundschuh et al. belegten in der MInT- Studie den durch Rituximab gewonnenen Überlebensvorteil auch für jüngere, Niedrigrisiko Patienten(89).

Für jüngere Patienten in lokalisierten Krankheitsstadien wurde vor Einführung der Rituximab Therapie ein abgekürztes CHOP Schema mit Radiatio der beteiligten Lymphregionen als Alternative diskutiert(108). Der Überlebensvorteil dieser Kombination aus 3- 4x CHOP + Radiatio verminderte sich jedoch nach Rituximab- Addition, sodass die Entscheidung zur Bestrahlung nun mehr individuell nach Risikofaktoren, beispielsweise dem Vorliegen großer Tumorkonglomerate  $\geq 10\text{cm}$ , gestellt werden sollte (45, 90, 109).

Des Weiteren gab es Versuche Alternativen zum R- CHOP Schema auch für Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu finden: Eine Arbeit der französischen Studiengruppe GELA untersuchte die Auswirkungen einer im Vergleich zu R- CHOP aggressiveren Therapie für Patienten  $< 60$  Jahre mit einem IPI- Risikofaktor. Das R- ACVBP Regime bestehend aus vier Zyklen Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vindesin, Bleomycin und Prednison gefolgt von einer Konsolidierungsphase mit Metothrexit, Ifosfamid, Etoposid und Cytarabin resultierte in höheren Progressionfreien- und Gesamtüberlebensraten (106).

Aufgrund seiner beschränkten Anwendbarkeit auf eine sehr begrenzte Patientengruppe, sowie der gesteigerten Toxizität und des ungünstigeren Nebenwirkungsprofils fand das R- ACVBP Schema trotz der publizierten Erfolge keine ausgedehnte klinische Anwendung (5, 45, 110). Eine retrospektive Auswertung der Daten dänischer Lymphom Patienten unter 61 Jahre mit hohem Risikoprofil legte erstmalig die Überlegenheit des R- CHOEP Schemas in diesem Patientenkollektiv dar (111). CHOEP schließt neben den in CHOP verwendeten Medikamenten zusätzlich Etoposid in das Therapieschema ein. In einer randomisierten Studie

belegten Schmitz et al. die Wirksamkeit von R- CHOEP für Patienten mit gleichem Risikoprofil (112).

Diese sowie weitere Arbeiten evaluierten ferner den Stellenwert der autologen Transplantation in jungen Hochrisiko Patienten. Keine der Publikationen konnte einen Überlebensvorteil für die Hochdosistherapie gefolgt von einer Stammzelltransplantation feststellen, sodass deren routinemäßiger Einsatz im Rahmen der Erstlinientherapie kontrovers bleibt (112-114).

In Anbetracht ihrer Begrenzung auf besondere klinische Konstellationen erreichte keines der als Alternative zu R- CHOP untersuchten Therapieverfahren die Anwendungsbreite und Popularität des Standardverfahrens (45, 90-92). Dies spiegelte sich auch in unseren Beobachtungen wieder: 35 von 42 (83%) Patienten mit DLBCL- NOS erhielten eine Variante des R- CHOP Schemas. Sechs Patienten aus dieser Gruppe unterzogen sich im Sinne einer supplementären Therapiemodalität der Radiatio befallener Regionen. Die Indikation hierzu wurde bei Vorliegen der Risikofaktoren Tumorkonglomerat, Befall des kontralateralen Hodens oder perivertebraler- bzw. Skelettmanifestationen gestellt.

14% der Patienten mit DLBCL- NOS in unserer Analyse wurde mindestens ein Zyklus einer Chemoimmuntherapie aus Rituximab und Bendamustin appliziert. R- B wird als Alternative bei Kontraindikationen gegen die Standardtherapie insbesondere bei älteren Patienten über 80 Jahre beziehungsweise Patienten in schlechtem Allgemeinzustand in Erwägung gezogen. Die Rate kompletter Remissionen in diesen Studienkollektiven reichte von 37- 54%, das Toxizitätsprofil war im Vergleich zur Standardtherapie deutlich günstiger (115, 116). Innerhalb der ersten 12 Monaten erreichte die Kurve des Progressionsfreien Überlebens ein Plateau als Hinweis auf die potentielle, wenn auch im Vergleich zu R- CHOP unterlegene Heilbarkeit aggressiver Lymphome durch R- Bendamustin (117).

In fünf der sechs von uns registrierten R- Bendamustin Applikationen waren die Patienten älter als 80 Jahre. Im Fall des unter-80 jährigen Patienten wurde diese Therapieentscheidung aufgrund von unter R- CHOP aufgetretenen Infekt Komplikationen gestellt. Aus unseren Daten ließen sich die Faktoren, die bei den Über- 80- Jährigen zur R- Bendamustin Therapie geführt haben nicht mehr im Einzelnen rekonstruieren. Möglicherweise begünstigten einerseits die in dieser Altersgruppe häufigen therapielimitierenden Komorbiditäten, Kontraindikationen gegen Anthrazykline und andererseits der große Erfahrungsschatz der Gießener Hämatologie mit dem B-R- Schema durch die Therapie indolenter Lymphome die Entscheidung zu R- Bendamustin.

Die Wahl des genauen Therapieregimes für dieses aggressive Lymphom richtete sich also in erster Linie nach dem Allgemeinzustand des Patienten, der Krankheitsausbreitung und den Risikofaktoren des einzelnen Patienten.

Die von uns observierten Differenzen in der Überlebensrate zwischen R- CHOP therapierten Patienten und solchen, die eine von diesem Protokoll abweichende Therapie erhielten sprachen für einen signifikant günstigeren Verlauf der Patienten unter Standardtherapie (Vierjahres- ÜLR 69 vs. 36%). Dieser Überlebensvorteil ist wohl auch wesentlich auf die unausgewogene Verteilung von Patienten mit ungünstigem klinischem Profil auf beide Gruppen zurückzuführen. Patienten mit abweichendem Therapieschema befanden sich bereits vor Therapiebeginn in schlechtem Allgemeinzustand bzw. unter palliativem Therapiekonzept. Der ungünstige Krankheitsverlauf führte so eher zur Wahl einer alternativen Therapieoption als umgekehrt.

In der Rezidivsituation hat sich die Hochdosistherapie und gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation sowohl vor als auch nach Einführung der Rituximabtherapie mit 3 bzw. 5- Jahres Überlebensraten von 49 bis 53% als beste therapeutische Option erwiesen (118, 119). In einer prospektiv randomisierten Studie verglichen Gisselbrecht et al. zwei Hochdosis Protokolle, R- ICE und R- DHAP in jüngeren Patienten. Nur etwa 50% der Patienten die sich einer Rezidivtherapie unterzogen erreichten die nötige Voraussetzung für die anschließende Transplantation. Die drei- Jahres Rate des Progressionsfreien Überlebens transplantierte Patienten betrug wiederum nur 50% (119). Der Anteil an Patienten der durch diese Therapiestrategie geheilt werden kann ist also sehr limitiert. Dementsprechend orientiert sich die Kurve der Überlebenswahrscheinlichkeit stark am Verlauf des Progressionsfreien Überlebens und unterstreicht daher die Bedeutung des Resultats der Erstlinientherapie für den weiteren Krankheitsverlauf(45, 98). Unter den in unserem Patientenkollektiv registrierten Rezidiven wurden drei Patienten nach Hochdosistherapie allogenen transplantiert. Zwei Patienten wurde eine Therapie aus R- Bendamustin appliziert.

## 4.3 Prognostik

### **4.3.1 Internationaler Prognostischer Index**

#### **4.3.1.1 Risikogruppen**

Der IPI wurde 1993 von Shipp et al. als Werkzeug zur prognostischen Stratifizierung der Patienten mit DLBCL etabliert (53). Die Optimierung bestehender Therapieverfahren oder die Einführung neuer, effizienterer Therapien kann die Trennschärfe zuvor gültiger Prognostik abschwächen. So wurde der IPI in der Rituximab- Ära bei insgesamt günstigerem Krankheitsverlauf zunächst kontestiert: Die 2007 von Sehn et al. publizierte Analyse konnte Patienten durch Stratifikation nach Standard- IPI lediglich in zwei prognostisch unterschiedliche Gruppen unterteilen. Eine alternative Zuordnung der Patienten unter Beibehaltung der gleichen Risikofaktoren im sogenannten r-IPI unterschied nunmehr drei Gruppen mit sehr gutem, gutem und ungünstigem Krankheitsverlauf. Ein Kritikpunkt der Autoren blieb die unzureichende Stratifizierung von Patienten mit sehr ungünstiger Prognose, da keines der IPI Verfahren eine prognostische Gruppe mit einer Vierjahres- Überlebensrate von unter 50% identifizieren konnte (54). Diese Beobachtungen wurden von Bari et al. im Wesentlichen bestätigt, obschon die Hochrisiko Gruppe in dieser Arbeit mit einer Überlebensrate von 35% nach drei Jahren deutlich ungünstiger verlief. In ihrer Analyse von Patienten, die vor und nach Einführung des Rituximab- Antikörpers therapiert wurden, beobachteten die Autoren, dass insbesondere Hochrisiko- Patienten am wenigsten von der Addition der Rituximab- Immuntherapie profitierten (98). In einer 1062 Patienten umfassenden retrospektiven Auswertung votierten Ziepert et al. hingegen erneut für die Gültigkeit des Standard- IPI in der Rituximab- Ära. Sie beobachteten Überlebensraten zwischen 59% und 92% nach drei Jahren (52). Eine aktuellere dänisch- kanadische Studie stützte sich zur exakteren Erfassung der IPI- Faktoren Krankheitsstadium und extranodale Manifestationen auf die PET- CT Diagnostik. Auch hier konnte die Gültigkeit des Standard- und r-IPI unter Chemoimmuntherapie generell bestätigt werden. Wiederrum konnte anhand des Index keine Risikogruppe mit sehr ungünstigem Verlauf identifizieren werden. Ferner diskriminierte der IPI kaum zwischen Patienten mit intermediär- hohem und hohem Risiko (Dreijahres- ÜLR 62 vs. 58%) (81).



Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die Distribution der Patienten in dieser Studie auf die einzelnen Risikokategorien sowie die ÜLR in der jeweiligen Kategorie. Die von uns vorgenommene Stratifizierung der in Gießen therapierten Patienten nach Standard-IPI ,bzw. aaIPI bei Patienten unter 61 Jahre, sowie r- IPI ergab vergleichbare Gruppenstärken wie die Referenzwerte obiger Studien.

Unter den von Ziepert et al. analysierten Patienten fand sich ein überproportional großer Anteil an Niedrigrisiko Patienten (52). Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine der drei Studien auf die sich diese retrospektive Analyse bezog, lediglich Patienten zwischen 18 und 60 Jahren mit günstigem Risikoprofil rekrutierte (89). Die Distribution der Gießener Patienten zeigte im Gegensatz hierzu eher eine Verringerung der Niedrigrisiko- Gruppe zugunsten der Intermediär- Hochrisiko Kategorie bei sonst konstantem Anteil der Niedrig- intermediär- und Hochrisiko Kategorie.

Gleichsam entsprechen die r-IPI Risikogruppen in ihren Überlebensraten in etwa den von Sehn et al. und El- Galaly et al. publizierten Daten. In unserem Kollektiv konnte also eine prognostisch exzellente Gruppe mit ÜLR von 100% von einer prognostisch günstigen und einer weiteren, prognostisch ungünstigen Gruppe unterschieden werden. Ebenso konnte der r-IPI auch in unserer Analyse keine Kategorie mit Dreijahres- ÜLR von <50% identifizieren, wenngleich zwei Drittel der registrierten Todesfälle in der Hochrisiko Kategorie auftraten.

**Tabelle 4.1: Patientenverteilung und Überlebensraten von IPI / r-IPI Risikogruppen**

IPI	Patienten (%)				3 Jahres- Überleben (%)			
	Sehn et al.	Ziepert et al.	El-Galaly et al.	Giessen 2007-11	Sehn et al.	Ziepert et al.	El-Galaly et al.	Giessen 2007-11
<b>Standard -IPI</b>								
Niedrig	28	52	31	23	82	91	95	100
Niedrig-intermed.	27	21	26	29	81	81	77	64
Hoch-intermed.	21	17	22	27	59	65	62	39
Hoch	24	10	21	21	63	59	58	64
<b>R- IPI</b>								
Sehr gut	10	-	11	10	94	-	100	100
Gut	45	-	46	40	81	-	78	74
Ungünstig	45	-	43	50	63	-	59	50

**Tab. 4.1:** Vergleich unseres Patientenkollektivs mit den Resultaten dreier Studien (52, 54, 81) im Hinblick auf die Verteilung der Patienten und die Dreijahres- Überlebensraten in den jeweiligen Risikogruppen. (Modifiziert nach Bari et al. 2010)

Auffällig ist hingegen der äußerst ungünstige Verlauf der Patienten mit hoch-intermediärem Risiko in dieser retrospektiven Auswertung. Die Überlebensrate weichte relativ zu den Beobachtungen anderer Autoren um mindestens 20% ab. Selbst im intra-Studienvergleich wurde für die erwartbar günstigere Intermediär- Hochrisiko Kategorie hier eine der Hochrisiko Gruppe unterlegene Prognose beobachtet. Die Progression der Häufigkeit der IPI- Risikofaktoren unter den Risikogruppen war indessen den Erwartungen entsprechend: Der relative Anteil der Patienten pro Risikogruppe mit dem jeweiligen Risikofaktor war in der Niedrig- intermediären Kategorie geringer als in der Intermediär- Hochrisiko Gruppe und hier wiederum geringer als in der Hochrisiko Gruppe. In Anbetracht des relativ guten Verlaufs der Hochrisiko Gruppe und des ungünstigeren Verlaufs der Intermediär- Hochrisiko Patienten könnte die Ursache dieser Inversion möglicherweise in einer unabhängig von den Risikofaktoren statistisch unausgeglichene Verteilung der Patienten beide Risikogruppen liegen: Werden die

Patienten aus den beiden Kategorien mit der ungünstigsten Risikokonstellation wie im r-IPI zusammengefasst, lag die Überlebensrate näher an den Ergebnissen anderer Studien (vgl. R- IPI „ungünstig“ in Tab. 4.1).

Ähnliche Schlussfolgerung zogen auch Sehn et al. 2007 in der retrospektiven Analyse des IPI unter Rituximab. Der Index stratifizierte die Patienten in zwei Gruppen: Einerseits Patienten mit Niedrig- und Niedrig- intermediärem Risiko, andererseits Patienten der beiden Hochrisiko Gruppen. Unter letzteren hatten Patienten mit intermediär- hohem Risiko, gleichsam unseren Beobachtungen, eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als Hochrisiko Patienten. Nach Distribution der Patienten analog r-IPI konnte, zusätzlich zu obigen Kategorien, eine Gruppe mit sehr guter Prognose abgegrenzt werden (54). Diese Ergebnisse wurden von einer weiteren retrospektiven Studie an Patienten älter als 60 Jahre gestützt. Nach Standard- IPI konnten keine signifikant unterschiedlichen Überlebensraten zwischen den Niedrigrisiko und Niedrig- Intermediärrisiko Kategorien detektiert werden. Der R- IPI war in diesem Kollektiv ebenfalls von eingeschränktem Nutzen, da unter Patienten älter als 60 Jahre keine prognostisch sehr gute Gruppe ohne Risikofaktoren identifiziert werden kann (57). Auch die von Ziepert et al. publizierten Daten, die dem IPI generelle Gültigkeit unter Immuntherapie zuschrieben, lassen in den Raten des Progressionsfreien- und Gesamtüberlebens nach vier Jahren eine fehlende Diskriminierung des IPI zwischen Patienten mit mindestens drei Risikofaktoren erkennen (52).

#### **4.3.1.2 Risikofaktoren**

Im Folgenden sollen Prävalenz und Einfluss der IPI- Risikofaktoren erörtert werden. Tab. 4.2 gibt einen Überblick über die Distribution der Patienten in unserer Auswertung und setzt unsere Beobachtungen in Relation zu vier weiteren retrospektiven Analysen.

Bei 42% der Patienten wurde die Ausbreitung des Lymphoms als Stadium III oder IV nach Ann- Arbor eingestuft. Verglichen mit den Beobachtungen anderer Autoren entspricht dieser Wert einem eher geringen Anteil an Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium. Dies ist insbesondere auf die niedrige Prävalenz an Patienten mit disseminierter oder diffus-infiltrativer Lymphomerkkrankung (Ann- Arbor Stadium IV) in unserer Analyse zurückzuführen.

**Tabelle 4.2: Inzidenz der IPI- Faktoren**

IPI Risikofaktor	Patienten (%)				
	Shipp et al.	Zhou et al.	Park et al.	El- Galaly et al.	Giessen 2007-11
	N=3273	N=1138	N=387	N=443	N=48
<b>Ann- Arbor Stadium</b>					
I	8	-	-	22	33
II	27	-	-	16	25
III	21	-	-	15	15
IV	45	-	-	46	27
III/IV	66	55	54	61	42
<b>Extranodale Manifestationen</b>					
Keine	30	-	-	33	21
1	38	-	-	31	56
>1	30	25*	29	36	13
<b>LDH erhöht</b>	40	49	54	50	50
<b>ECOG ≥2</b>	18	37	9	17	40

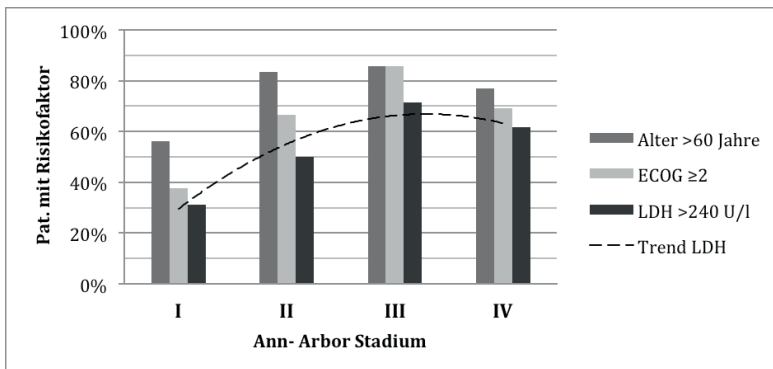
**Tab. 4.2.:** Vergleich der Inzidenz der IPI Risikofaktoren anhand der Daten aus vier retrospektiven Studien (53, 55, 81, 100).

\* Extranodaler Befall nur aus Knochenmark, Lunge, ZNS, GI- Trakt.

Der Stellenwert der Ann- Arbor Stadieneinteilung ist für das DLBCL kontrovers. In mehreren multivariaten Analysen konnte das Krankheitsstadium nicht auf signifikantem Niveau in Korrelation zum Gesamtüberleben gesetzt werden (100, 101). El- Galaly et al. belegten hingegen in einer multivariaten Analyse nach Anpassung an LDH, ECOG und Alter eine signifikante Assoziation zum Gesamtüberleben des Ann- Arbor Stadiums IV im Vergleich zu Stadium I-III (81). Diese Ergebnisse werden gestützt durch die Dokumentation, dass Patienten bei gleichem IPI- Punktwert, aber höherem Krankheitsstadium eine deutlich schlechtere Prognose haben als Patienten in lokalisierten Stadien (120). Dieser Effekt lies sich jedoch nicht in unserer Analyse

aufzeigen. Die Prognose der Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien war jenen in Stadium I/II nicht unterlegen. Etwaige Risiken für Ungenauigkeiten in der Stadieneinteilung der Patienten liegen gegebenenfalls in dem retrospektiven Charakter der Auswertung und Befundinterpretation von Staging- Untersuchungen und könnten sowohl die unterproportionierte Zahl der Patienten im Stadium IV und folglich auch den fehlenden Einfluss der Krankheitsausbreitung auf die Prognose erklären.

Da das Krankheitsstadium nur retrospektiv aus den in der Patientenakte dokumentierten Angaben übernommen bzw. abgeleitet wurde, ist die Güte der Stadieneinteilung nicht direkt nachvollziehbar. Tatsächlich kann sich die genaue Befundinterpretation schwierig gestalten (120): Die Distinktion eines vom Lymphknoten ausgehenden von einem solitären extranodalen Befall ist beispielsweise entscheidend für die Zuordnung zwischen Stadium II oder IV (50, 121). Obgleich keine direkte Assoziation des Ann- Arbor Stadiums mit dem Gesamtüberleben gesehen wurde, konnten wir dennoch eine Zunahme der Risikofaktoren mit dem Progress des Krankheitsstadiums bis Stadium III beobachten (s. Abb. 4.1).



**Abb. 4.2:** Auftreten von IPI- Risikofaktoren je Krankheitsstadium

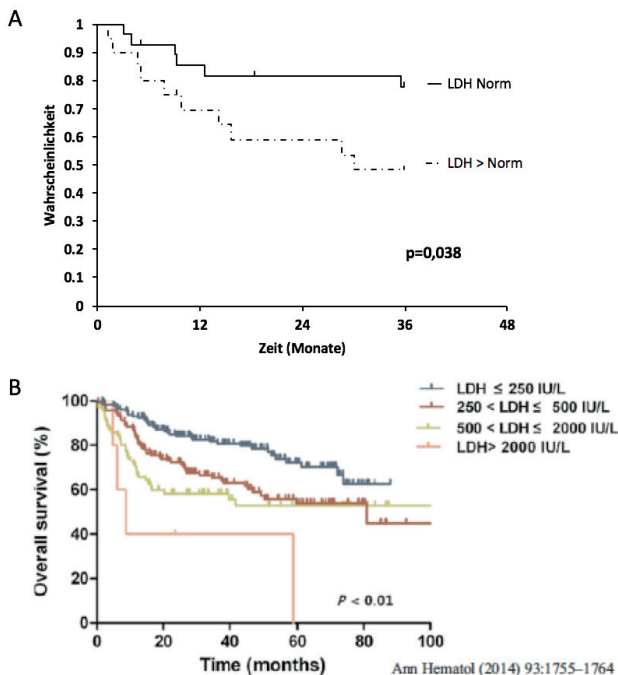
Die Säulen zeigen den prozentualen Anteil an Patienten mit den untersuchten Risikofaktoren im jeweiligen Krankheitsstadium. Die gestrichelte Linie nähert den Trend der Prävalenz von Patienten mit LDH- Erhöhung mit zunehmendem Ann- Arbor Stadium. ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score, LDH= Laktat- Dehydrogenase.

Der Anteil an Patienten mit einer Erhöhung der LDH in unserer retrospektiven Auswertung ist vereinbar mit den Angaben anderer Autoren( s.Tab. 4.2).

In mehreren Publikation wurde in multivariaten Analysen von einem signifikanten Assoziation der LDH Erhöhung zu dem beobachteten Gesamtüberleben berichtet (52,

101). In einer Evaluation an 382 Patienten mit relativ günstigem Risikoprofil von Park et al. erwies sich die LDH unter den fünf erfassten IPI- Risikofaktoren als der Faktor mit dem größten Einfluss auf Ereignisfreies- und Gesamtüberleben (100). In einer 2014 publizierten Modifikation des IPI, dem sogenannten NCCN- IPI wurde dokumentiert, dass der Einfluss der LDH- Spiegel auf das Gesamtüberleben eine Progression bis zum dreifachen der LDH- Norm zeigt. Über- normwertige LDH- Spiegel und mehr als 3x- erhöhte LDH Spiegel waren also jeweils prognostische Faktoren für ein unterlegenes Gesamtüberleben (55).

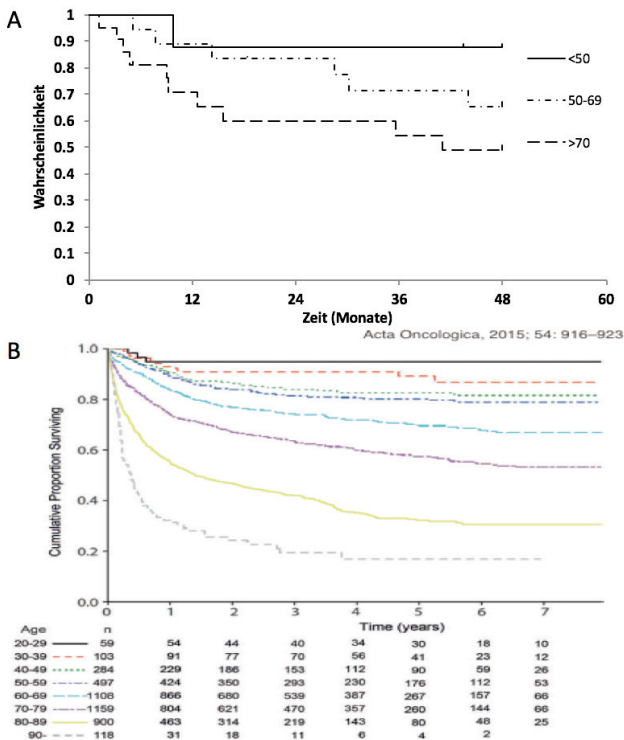
Die von uns ermittelten Differenzen zwischen Patienten mit und ohne erhöhte LDH- Spiegel waren ebenfalls suggestiv für den Einfluss der LDH auf das Gesamtüberleben. Anders als von Park et al. und Zhou et al. ermittelt, war dieser Effekt nicht signifikant und ohne Progression des Risikoprofils bei >2x erhöhten LDH- Level. So betrug die Differenz in der Dreijahres Überlebensrate zwischen Patienten mit LDH- Norm und >1- 2x erhöhter Norm 30% (Dreijahres- ÜLR 78% vs. 48%,  $p=0,038$ ; s. Abb.4.2). Jene Patienten mit LDH- Werten >2x der Norm hatten in unserer Studie hingegen einen exzellenten Verlauf. Diese Beobachtung widerspricht den in der Literatur publizierten Resultaten. Möglicherweise resultieren diese hohen LDH- Spiegel aus der akzidentellen Erfassung der Werte nach Therapiestart, wodurch die tatsächlichen, bzw. prätherapeutischen Spiegel maskiert wurden.



**Abb.4.2:** Gesamtüberleben nach LDH- Werten. *Tafel A* zeigt den Verlauf in unserer Analyse. *Tafel B* kontrastiert das Gesamtüberleben von Patienten mit normwertiger LDH zu LDH- Erhöhungen in drei Graduierungen, aus Park et al.: Ann Hematol. 2014;93:1755-1764

In einer 7165 DLBCL- Patienten umfassenden Registerstudie ermittelten Hedström et al. einen Altersmedian von 68 Jahren (99). Dies korrespondiert mit dem Altersmedian von 67,5 Jahren in unserer Patientengruppe. Obgleich multivariate Analysen keine signifikante Assoziation des Alters auf das Gesamtüberleben aufzeigen konnten (100, 101), kommen andere Publikationen zu gegensätzlichen Schlüssen (52). Mit dem Ziel die Risikostratifizierung älterer Patienten zu verbessern führten Advani et al. eine weitere Altersgrenze für Über- 60 Jährige ein. Der e- IPI wertet erfasst das Alter  $\geq 70$  Jahre als zusätzlichen Risikofaktor und erweitert so die prognostische Unterteilung älterer Patienten (57). Der NCCN- IPI unterteilt den Risikofaktor „Alter“ in drei Gruppen: 41-60 Jahre, 61- 75 und >75 Jahre. Diese Unterteilung beruht auf der Erkenntnis der linearen

Risikoproggression mit je 15-20 Jahren Altersunterschied (55). Hedström et al. dokumentierten diese Risikoproggression für Interquartilen von je 10 Jahren ab einem Ausgangsalter von 20 Jahren in einer schwedischen Registerstudie (99). Die Altersgrenze von 60 Jahren hatte als Risikofaktor einen deutlichen, grenzwertig signifikanten Einfluss ( $p=0,057$ ) auf das Gesamtüberleben in unserem Patientenkollektiv. Gleichsam ließ sich die Risikoproggression ausgehend von einem Alter von 50 Jahren je 20 Jahre Altersunterschied darstellen (vgl. Abb. 4.3). Auch wenn unserer Analyse die statistische Aussagekraft fehlt den von anderen Autoren beschriebenen Effekt zu belegen, konnte die Relevanz des Alters als Risikofaktor auch in unserer Auswertung reproduziert werden.



**Abb. 4.3:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Altersgruppen. *Tafel A* Verläufe in drei Altersgruppen unter den in Giessen erfassten Patienten. *Tafel B* Altersgruppen in 20 Jahres Interquartilen; aus Hedström et al. Acta Oncologica, 2015; 54:916-923.



Der IPI unterscheidet als Risikofaktor den einzelnen extranodalen Befall von mindestens zwei extranodalen Manifestationen. Ähnlich wie für den Risikofaktor Alter lässt sich auch mit wachsender Anzahl an extranodalen Lymphomen ein stufenweiser Progress des Risikos feststellen: El- Galaly berichteten von einer Differenz von etwa 30% in den Überlebensraten zwischen Patienten mit 1-2 ENM und vier ENM (81). Der NCCN- IPI berücksichtigt die meisten extranodalen Manifestationen aufgrund fehlender Signifikanz nicht, wohl aber den Befall großer Organe (ZNS, GI- Trakt, Lunge, Knochenmark) als stärkeren Prädiktor des Gesamtüberlebens (55). Unsere Evaluation belegt tendenziell den ungünstigeren Verlauf der Patienten mit mindestens zwei ENM, auch wenn die detektierten Unterschiede unterhalb des Signifikanzniveaus blieben. Eine weitere Graduierung ebenso wie die Darstellung der Risikoprogression mit zunehmender Anzahl an ENM ließ der Umfang des hier untersuchten Patientenkollektivs nicht zu.

Neben den zuvor besprochenen vier Faktoren fließt als fünfter Risikofaktor der Allgemeinzustand nach ECOG- Skala in die Risikostratifizierung nach IPI und aaIPI ein. Der ECOG unterscheidet ambulante Patienten von bettlägerigeren Patienten. Letzteren werden, je nach Restmobilität Werte zwischen 2 -4 auf der ECOG Skala zugewiesen. In unserer Studie wurde eine stationär durchgeführte Therapie als Surrogat für ECOG  $\geq 2$  gewertet. Verglichen mit den von anderen Autoren beobachteten Distributionen erscheint der Anteil von 40% der in Giessen erfassten Patienten mit ECOG  $\geq 2$  hoch (s. Tab. 4.2). Es ist zu erwarten, dass die klinischen Eigenschaften je nach Patientenkollektiv und Versorgungszentrum variieren. Ein Universitätsklinikum als tertiärer Versorgung wird tendenziell eher Patienten in schlechtem Allgemeinzustand und ungünstigerem Verlauf therapieren als kleinere, vorgeschaltete Krankenhäuser oder niedergelassene Fachärzte. Dieser Bias durch Präselektion von Patienten in reduziertem Allgemeinzustand, dürfte zu deren überproportional hohem Anteil in unserer Studie beigetragen haben. Andererseits zeigen die publizierten Daten von Registerstudien aus Dänemark und Kanada mit 26 und 37% respektive wiederum ECOG  $\geq 2$ - Anteile an Patienten, die auch außerhalb großer Zentren therapiert wurden und näher an unseren Beobachtungen liegen (55, 99). Der signifikante Einfluss des Allgemeinzustands auf das Gesamtüberleben ist gut dokumentiert (52, 55, 99, 101). Wurde der Verlauf ambulanter von nicht- ambulanten Patienten in unserer Evaluation

kontrastiert, ergab sich für Patienten mit ECOG  $<2$  ein Überlebensvorteil von 31% nach 48 Monaten ( $p=0,03$ ).

Zusammenfassend erwiesen sich die Risikofaktoren Alter  $>60$  und ECOG  $\geq 2$  auf Grundlage unserer Daten als am aussagekräftigsten. In Ergänzung mit den übrigen Faktoren ließen sich auf deren Grundlage im revidierten IPI drei prognostische Gruppen mit sehr heterogenem Verlauf darstellen.

#### **4.3.1.3 Vom IPI unabhängige klinische Risikofaktoren**

Tumorkonglomerate, B- Symptome und die Manifestation des Lymphoms im Knochenmark wurden vor der Rituximab- Ära als Risikofaktoren neben dem IPI etabliert (53) und in ihrem Auftreten auch in unserer Analyse erfasst.

Lymphome mit Durchmessern von über 5- 10cm werden als Konglomerat bzw. Bulk bezeichnet. Nach Einführung der Rituximab- Komponente in das R- CHOP Schema ist der Stellenwert dieser Tumorkonglomerate als Risikofaktor umstritten: Yang et al. attestierten Tumoren mit einem Durchmesser  $\geq 10$ cm in multivariaten Analysen signifikanten Einfluss auf CR und die Zeit bis zum Therapieversagen, nicht jedoch auf das Gesamtüberleben (101). In der Auswertung der MInT -Studie an jungen Niedrigrisiko Patienten hingegen erwies sich jeder Tumor mit einem Durchmesser zwischen 6 und 10cm als prognostischer Faktor für ein signifikant unterlegenes Gesamtüberleben (89, 122). In unserer Erfassung des Parameters „Tumorkonglomerat“ folgten wir den im Krankheitsverlauf dokumentierten Einstufungen ohne einen Minstdurchmesser zugrunde zu legen. Die so registrierten Patienten mit Lymphombulk hatten eine überdurchschnittlich hohe Mortalitätsrate von 50%. Angesichts der geringen Anzahl von Patienten mit Bulk lässt sich hieraus allerdings kein allgemeingültiger Trend ableiten.

Das Auftreten von B- Symptomen hat auch in der Rituximab- Ära einen ungünstigen Einfluss auf das kurz- bis längerfristige Überleben (123, 124). Auch unter Gießener Patienten konnte, bei einer Differenz von schätzungsweise 10% in den Dreijahres- Überlebensraten, eine nicht signifikante Unterlegenheit bei Vorliegen von B- Symptomen beobachtet werden (ÜLR B- vs. A- Symptome: 59 vs. 69%).

Annähernd 10- 22% der Knochenmarkbiopsien von Patienten mit DLBCL zeigen ein Lymphominfiltrat (53, 81, 125, 126). Dieses Infiltrat besteht mit ähnlicher Häufigkeit aus konkordanten Lymphomzellen oder diskordanten, bzw. indolenten Lymphomen (125, 126). Chung et al.(125) und Sehn et al.(126) berichteten übereinstimmend, dass der Einfluss des Knochenmarkbefalls auf das Gesamtüberleben im Wesentlichen auf die mit dem konkordantem Befall assoziierte ungünstige Prognose zurückzuführen ist. Die von Sehn et al. publizierten Daten wiesen die konkordante Knochenmarksinfiltration darüber hinaus als vom IPI unabhängigen Risikofaktor für Progressionsfreies- und Gesamtüberleben aus. El Galaly et al. detektierten über das PET- CT in 29% der Fälle Knochen bzw. Knochenmarksinfiltrationen verglichen mit 10% in der Knochenmarksbiopsie. Die in der Biopsie festgestellte Infiltration hatte keinen signifikanten prognostischen Einfluss. PET- CT- positive Infiltrate waren indessen mit einem signifikant ungünstigeren Verlauf assoziiert (81).

Wir registrierten eine Infiltration des Knochenmarks in ca. 13% der Patienten. Unsere Ergebnisse zeigten keine relevanten Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen Knochenmark- positiven und -negativen Patienten und sind somit vereinbar mit den Beobachtungen von El- Galaly et al. . Indessen besteht eine Koinzidenz der Knochenmarksmanifestation mit einem Hochrisiko- IPI in fünf der sechs Patienten mit Knochenmarkinfiltration.

Werden die Patienten mit nicht den IPI- Faktoren Bulk, B- Symptome oder Knochenmarksinfiltrat in einer Gruppe zusammengefasst, so divergieren die geschätzten Überlebensraten dieser Patienten von Patienten ohne zusätzliche Risikofaktoren nach vier Jahren um 22% (Medianes Überleben bei Risikofaktor: 44 Monate vs. nicht erreicht;  $p=0,19$ ).

Letztlich beschrieb das Vorliegen dieser nicht in den IPI einfließenden Risikofaktoren einen tendenziell ungünstigeren Verlauf. Auch die Zusammenfassung dieser Faktoren stratifizierte Patienten jedoch nicht in signifikant unterschiedliche Gruppen.

#### **4.3.2 Hans Algorithmus**

Die Distribution der Subtypen war in diversen Publikationen ausgewogen (65, 66, 72, 75). Tatsächlich lässt sich aber mit steigendem Alter des Patientenkollektivs ein

Zuwachs der Proportion an Nicht- GCB Lymphomen beobachten: So registrierten Mareschal et al. in einer GEP- Analyse von Patienten mit einem, unserer Studie ähnlichen Altersmedian, einen GCB- Anteil von 45% (102).

Wir ordneten nach Hans- Algorithmus 48% der Lymphome dem GCB und 52% dem Non-GCB Subtyp zu. Die an anderer Stelle festgestellte Assoziation CD10- positiver Lymphome mit einem jüngeren Patientenalter konnten wir nicht reproduzieren (59). Der Anteil an über 60- Jährigen unterschied sich in der retrospektiven Auswertung weder in den GCB- / Non- GCB noch den CD10 positiven oder negativen Lymphomen substantiell.

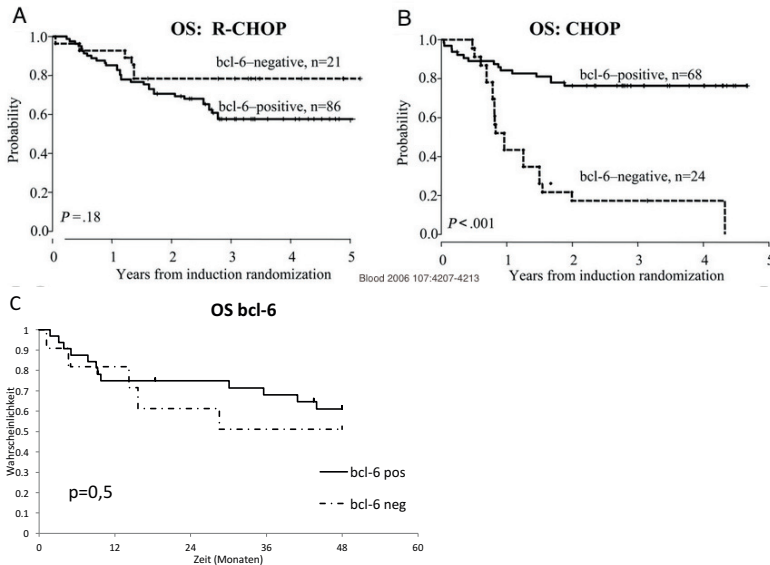
Die Ergebnisse über den prognostischen Stellenwert einzelner immunhistochemischer Färbungen sind widersprüchlich: Hans et al. etablierten diesen IHC- Algorithmus in der Prä- Rituximab- Ära. Die publizierten Daten ergaben ein signifikant überlegenes Gesamtüberleben nach fünf Jahren für Patienten mit bcl-6 positiven Lymphomen, sowie ein tendenziell bessere Überleben für CD10- positive und MUM1- negative Lymphome (66). Eine an R-CHOP therapierten Patienten durchgeführte Untersuchung assoziierte CD10 positive bzw. MUM1 negative Lymphome mit einem signifikant günstigeren Verlauf. Dieser Zusammenhang galt allerdings nicht für bcl-6 (65). Coutinho et al. fanden indessen unter Chemo- Immuntherapie keinen signifikanten Einfluss eines einzelnen immunhistochemischen Markers auf den Krankheitsverlauf (59).

Auch in unserer Evaluation erreichte keine der unter IHC- Aspekten festgestellten Differenzen im Krankheitsverlauf ein signifikantes Niveau. Allerdings konnte dem CD10- Phänotyp als Surrogat des GCB- Lymphoms ein tendenziell günstigerer Verlauf zugeordnet werden.

Bcl- 6, ebenso Keimzentrumsmarker, war bei vorliegender Expression gleichfalls mit einem leicht günstigeren Verlauf assoziiert. Diese prognostische Differenz manifestierte sich für bcl-6 erst etwa 18 Monate nach Erstdiagnose. Zuvor zeigten die Überlebenskurven für den jeweiligen bcl-6 -Phänotyp keine Divergenz. Ähnliche Beobachtung im Hinblick auf die Divergenz im zeitlichen Verlauf wurde auch von Winter et al. geteilt:

In einer Analyse über den Einfluss der Rituximab- Therapie auf die Prognostik bcl- 6 positiver Lymphome stellte sich die bcl-6 Expression unter R-CHOP therapierten Patienten innerhalb der ersten 18 Monate als prognostisch indifferent heraus. Im weiteren Verlauf und im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, erwies sich die bcl-6-  
66

Positivität hier allerdings als prognostisch tendenziell unvorteilhaft: Anders als zuvor unter CHOP- Therapie schien der bcl-6 negative Phänotyp deutlicher als das bcl-6 positive Pendant von der Rituximab- Immunotherapie zu profitieren und mit einem nun mehr günstigeren Verlauf assoziiert zu sein (127).



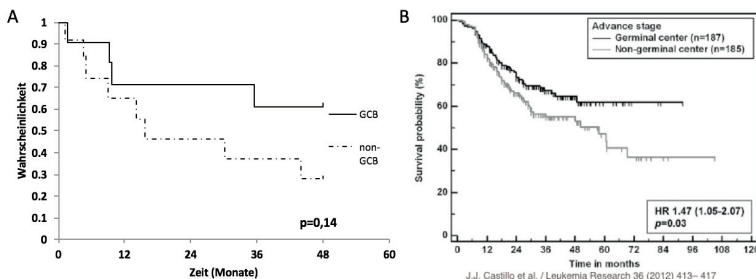
**Abb. 4.4:** Gesamtüberleben bcl-6 positiver und -negativer Lymphome unter Rituximab (*Tafel A*) und vor Rituximab (*Tafel B*); aus Winter et al., Blood 2006;107:4207-4213. (*Tafel C*) Verlauf in unserer Analyse.

Der prognostische Wert des Hans Algorithmus wird kontestiert: Fu et al. berichteten von signifikant abweichenden Überlebensraten zwischen GCB und Non- GCB Lymphomen (Drei- Jahres ÜLR 85 vs. 69%,  $p=0,032$ ) (71). Zu gleichem Schluss kam eine andere Arbeit, die acht auf IHC- basierende Algorithmen verglich (61). Weitere Ergebnisse zeigten zumindest ein signifikant besseres Therapieansprechen bzw. progressionsfreies Überleben für den GCB- Subtyp (65, 69). Andere Autoren beobachteten ebenfalls, wenn auch nicht auf signifikantem Niveau, den günstigeren Verlauf der GCB Lymphome (59, 67, 72, 75). Ott et al. analysierten 352 Fälle einer prospektiven Studie auf die prognostische Aussagekraft des Hans- Algorithmus. Hier

wurden, trotz initial ungünstigerer Risikokonstellation in der Non- GCB Gruppe, keine Unterschiede in den Verlaufsparemtern zwischen beiden Subtypen gefunden (51). Auch in unserer Analyse erwies sich die prognostische Trennschärfe des Algorithmus auf das Gesamtkollektiv bezogen als unzureichend (Vierjahres- ÜLR GCB/ Non- GCB 64 vs. 57%;  $p=0,7$ ). Angesichts des limitierten Umfangs unseres Studienkollektivs wäre eine signifikante Differenz nur bei außergewöhnlich großen Unterschieden in den Überlebensraten zu erwarten gewesen. Selbst fern von statistischer Signifikanz waren die Krankheitsverläufe der Gruppen auch dann zu ähnlich, als dass sich klare Tendenzen daraus ableiten ließen.

Je nach Subgruppe erlaubte die Stratifizierung durch den Algorithmus jedoch eine höhere Trennschärfe: Mithilfe des Hans Algorithmus konnte die prognostische Unterteilung der Patienten aus den Hoch- und hochintermediären IPI- Risikokategorien verfeinert werden. Alle Todesfälle in der Hochrisiko Gruppe traten unter Non- GCB klassifizierten Patienten auf. Somit identifizierte der Non- GCB Typ in dieser Subgruppe ein Kollektiv mit einer Vierjahres- Überlebensrate von schätzungsweise 27% ( $p=0,04$ ). Patienten mit 3-5 IPI- Risikofaktoren hatten in der GCB- Gruppe ein Gesamtüberleben von 61%, vs. 28% in der Non- GCB Gruppe (Medianes Überleben nicht erreicht vs. 15,6 Monate;  $p=0,14$ ).

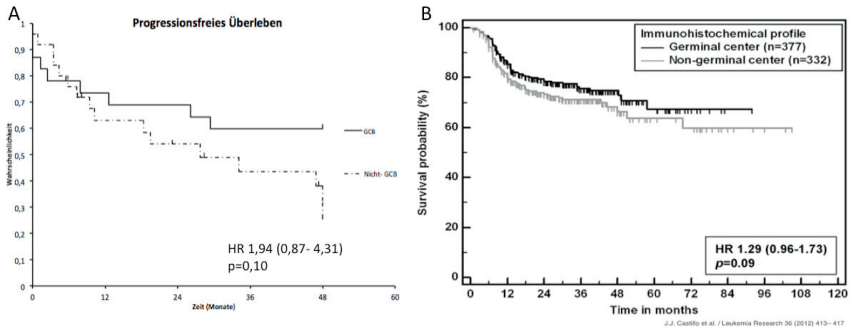
Ebenso wie die Relevanz des Hans- Algorithmus für das Gesamtkollektiv ist auch seine Aussagekraft in Subgruppen kontrovers. Castillo et al. beobachteten, dass der aus IHC- abgeleitete Non- GCB Subtyp am ehesten unter Männern prognostisch ungünstig ist. Zudem wurde der Non- GCB Subtyp in jener Publikation insbesondere in fortgeschrittenen Krankheitsstadien mit einem unterlegenen Gesamtüberleben assoziiert (72). In den von Visco et al. publizierten Daten korrelierte der Non- GCB Phänotyp mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (entsprechend Ann- Arbor  $\geq 3$ ). In den IPI- Subgruppen konnte der Hans- Algorithmus eine prognostisch exzellente Patientengruppe mit 0-1 Risikofaktor und GCB Typ, sowie eine prognostisch besonders ungünstige Gruppe aus Patienten mit 4-5 Risikofaktoren und Non- GCB Typ aufzeigen (65). Unsere Beobachtung über die Relevanz der IHC in Hochrisiko Patienten steht also in gewisser Konkordanz zu den Ergebnissen dieser Autoren (vgl. Abb. 4.5).



**Abb. 4.5:** Verlauf der GCB und non- GCB Lymphome nach Hans – Algorithmus in Patienten mit >3 Risikofaktoren, unsere Analyse (*Tafel A*) bzw. fortgeschrittenem Krankheitsstadium, aus Castillo et al. Leuk Res 2012;36:413-417 (*Tafel B*).

In dieses Bild fügt sich auch die Distribution der von uns registrierten Patienten mit rezidivierter Lymphomerkrankung: Das progressionsfreie Überleben ist in dieser retrospektiven Analyse aufgrund der Datenqualität und der Tatsache, dass nicht alle Patienten am Universitätsklinikum vollständig therapiert bzw. nachkontrolliert wurden kein sehr belastbarer Parameter. Wir registrierten innerhalb von 48 Monaten nach Therapiebeginn 11 Rezidive. 73% dieser Rezidive fielen auf Lymphome die als Non- GCB klassifiziert wurden. Auch die Kaplan- Meyer Schätzung des progressionsfreien Überlebens, als kombiniertem Endpunkt aus rezidivierter Erkrankung oder Versterben, weist den GCB- Subtyp in unserer Analyse als prognostisch deutlich günstiger aus. Wiederrum lagen diese Unterschiede nicht auf signifikantem Niveau.

Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den Resultaten von Castillo et al., die in einer Analyse von 712 Patienten auf univariatem Niveau einen statistischen Trend der Non- GCB Gruppe zu unterlegenem PFS beobachteten. Die Autoren konnten diese Observationen ebenfalls nicht in multivariaten Analysen bestätigen (vgl. Abb. 4.6) (72).



**Abb. 4.6:** Progressionsfreies Überleben nach Hans- Klassifikation im Giessener Patientenkollektiv (*Tafel A*) und der Analyse von Castillo et al. (72) (*Tafel B*).

Bei der Interpretation unserer retrospektiven Daten sollte bedacht werden, dass das progressionsfreie Überleben mutmaßlich insbesondere dann gut dokumentiert ist, wenn der Patient einen klinisch ungünstigen Krankheitsverlauf hatte und sich daher sehr regelmäßig zu Nachuntersuchungen vorstellte. Eine Häufung dieser Krankheitsverläufe unter dem Non- GCB Typ könnte also die Distribution der Rezidive zu Ungunsten dieses Subtyps verzerren.

Als mögliche Ursache für die uneinheitlichen Resultate über die Aussagekraft des Hans Algorithmus wird in der Literatur wiederkehrend die korrekte Interpretation der bcl- 6 Antikörperfärbung thematisiert. Coutinho et al. berichteten von einer widersprüchlichen Assoziation der bcl-6 Expression sowohl mit Keimzentruns- als auch mit ABC- Markern. Ferner ergab die Befundung der bcl-6 Färbung unter den in den gängigen Algorithmen verwendeten Antikörpern die geringste Übereinstimmung zwischen Untersuchern. Die Autoren führten dies auf die im Gegensatz zu anderen Färbungen fehlende Implikation von bcl-6 in der Routinediagnostik zurück (59). Diese Beobachtungen werden von De Jong et al. und Lawrie et al. ergänzt. Beide Arbeiten untersuchten die Zuverlässigkeit immunhistochemischer Verfahren in der Diagnostik des DLBCL. Die Bcl-6 – Färbung war am schwierigsten zu befunden und produzierte die größte diagnostische Varianz, insbesondere dann, wenn Untersucher interinstitutionell befundeten. CD10 war hingegen übereinstimmend der Antikörper, der die größte Übereinstimmung in den Befunden produzierte (76, 77). In ihrer Evaluation der diagnostischen Präzision der IHC unter Schweizer Patienten kamen Reber et al. zu dem Schluss, dass in Ergänzung zu oben Genanntem auch die Übereinstimmung in der



Interpretation zwischen Routinediagnostik und Forschungsdiagnostik stark abwich. In Routinelabors wurden mal keine einheitlichen, mal die in der Literatur vorgeschlagenen Grenzwerte zur Interpretation der Antikörper- Positivität festgelegt (128). Die uneinheitliche Methodik der IHC- Protokolle erstreckt sich über die Interpretationsstandards hinaus auch auf die Vielfalt verwendeter Antikörper für bcl-6 Färbungen (72).

Diese Erkenntnisse dürften zu gewissen Anteil auch in unserer Studie zur fehlenden Trennschärfe des Hans- Algorithmus kontribuiert haben. Zwar wurde die am Institut für Pathologie des Uniklinikums Giessen nachträglich durchgeführte Immunhistochemie von einem einzelnen Untersucher intrainstitutionell und gemäß den von Hans et al. vorgeschlagenen Grenzwerten für die Positivität der Marker interpretiert. Die in der Patientenakte dokumentierte, zuvor durchgeführte Befundung vereint hingegen mehrere der oben geschilderten Probleme: Zum einen ist es wahrscheinlich, dass in Anbetracht der Vielzahl der Literaturberichte hierzu und der Befundherkunft aus mehreren auswärtigen Instituten für Pathologie, auch in unserer Studie uneinheitliche Antikörper zur bcl-6 Färbung verwendet wurden. Zum anderen besteht in unserer Einstufung ebenfalls die Diskrepanz zwischen Forschungsdiagnostik, also den nachträglich klassifizierten Lymphombiopsaten und den aus der Routinediagnostik, also den aus der Patientenakte stammenden Befunden. Des Weiteren konnten wir selbst in der Nachklassifikation eine große Schwankung der Färbequalität in Abhängigkeit des Biopsatalters feststellen.

In unserer Analyse registrierten wir 18 Lymphome als CD10- positiv. Das entspricht einem Anteil von 78% der GCB- Lymphome bzw. 37% der Gesamtlymphome. Die Klassifikation der Ursprungszelle in den übrigen 63% hing also von der Interpretation der bcl-6 Färbung ab. Somit wurde die Festlegung des IHC- Phänotyps in einem substanziellen Anteil unter Umständen durch zuvor geschilderte Problematik beeinflusst.

Neben den Unzulänglichkeiten der immunhistochemischen Methodik sehen wir ferner die Beschränkungen, die in statistischer Aussagekraft und der Vergleichbarkeit mit anderen Publikationen, mit den relativ geringen Patientenzahlen einhergehen. Selbst eine Ausweitung des Studienumfangs hätte angesichts marginaler Differenz in den Überlebensraten der jeweiligen Ursprungszellen die statistische Aussagekraft erhöht, die Verlässlichkeit des Algorithmus jedoch nicht weiter stärken können. Ein größerer

Patientenumfang hätte die jedoch zumindest die Relevanz des Algorithmus in Subgruppenanalysen, wie zum Beispiel unter Hochrisiko- Patienten mit  $\geq 3$  IPI- Faktoren steigern können.

Grauzonen- und primäre ZNS- Lymphome wurden erst seit der WHO Klassifikation von 2008 als separate Entität eingestuft. Diese Entitäten gehen mit einem aggressiven und prognostisch ungünstigen Verlauf einher (18). Primäre ZNS- Lymphome zeichnen sich weiterhin durch einen hohen Anteil an non- GCB Lymphomen und möglicherweise eine biologisch vom nodalen DLBCL abweichende Ursprungszelle aus (129, 130). Obwohl diese Gruppe nur 6% der Gesamtpatienten in unserer Studie umfasste, ist der Einschluss dieser Entität in das Studienkollektiv angesichts dieser biologischen und klinischen Eigenheiten doch kritisch zu werten.

Ferner erhielten etwa 25% der Patienten ein vom Standard abweichendes Therapieschema. Die Motive für die Wahl eines Nicht- R-CHOP Schemas wurden bereits zuvor erörtert. Denkbar ist, dass neben der abweichenden Therapie auch die dieser Entscheidung zugrunde liegende Konstitution, wie zum Beispiel ein stark reduzierter Allgemeinzustand, die Vergleichbarkeit der IHC- Prognostik für das Gesamtkollektiv einschränkte. Unter diesen, per se prognostisch ungünstigen Konstellationen ist bei insgesamt niedrigen Überlebensraten auch auf Basis der IHC- Stratifizierung eine signifikante Divergenz der Verläufe unwahrscheinlich.

Wir wählten für unsere Evaluation des Gesamtüberlebens einen Analysezeitraum von vier Jahren. Über diesen Zeitraum hinweg ergaben sich keine signifikanten Abweichungen im Verlauf von GCB und non- GCB Patienten. In einer Langzeitauswertung von R- CHOP therapierten Patienten beobachteten Coiffier et al. Spätrezidivraten auch über fünf Jahre nach Therapiebeginn von ca. 10% (85). Auch Sehn et al. berichteten von substanziellen Änderungen im Vergleich des Fünfjahres- und Neunjahres- Verlaufs von Patienten, die mit Radiotherapie behandelt wurden: Die zum Zeitpunkt von 60 Monaten initial überlegene Therapiemodalität stellte sich im Langzeitverlauf aufgrund der Spätrezidive und –Todesfälle als unterlegen heraus (109). Angesichts dieser Erkenntnisse könnte also über eine etwaige, sich erst im Langzeitverlauf abzeichnende Differenz zwischen den von uns determinierten IHC- Subtypen spekuliert werden. Die von Maurer et al. publizierten Daten über die Validität des Ereignisfreien Überlebens als Surrogat für das Gesamtüberleben bescheinigen Patienten, die 24 Monaten ereignisfrei überlebten, hingegen eine der

Allgemeinbevölkerung entsprechende Überlebenswahrscheinlichkeit (131). Demnach scheint der von uns gewählte Beobachtungszeitraum adäquat und garantiert bei retrospektiver Datenerfassung zudem eine bessere Datenqualität als Langzeitbeobachtungen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Studie war die Evaluation der am häufigsten verwendeten klinischen und immunhistochemischen Prognostik in der Ära der Rituximab- Immuntherapie von DLBCL. Grundlage waren die Beobachtungen mehrerer Autoren, dass der vor der Einführung der Rituximab etablierte IPI in der Ära der Immuntherapie nur noch eingeschränkte Gültigkeit habe (57, 98). Neben dem auf klinischen Faktoren fußenden IPI können DLBCL entsprechend ihrer Ursprungszelle mittels GEP in drei Subtypen klassifiziert werden: GCB, ABC und Typ 3 (15, 58). Als Surrogat für die durch aufwendige GEP ermittelte Ursprungszelle wurden immunhistochemische Algorithmen, wie der Hans- Algorithmus, entwickelt, auf deren Grundlage sich DLBCL in GCB und non-GCB Typen unterscheiden lassen (66). Analog dem IPI wurde auch die Aussagekraft des Hans- Algorithmus nach Addition von Rituximab zum CHOP- Schema geschmälert und dessen prognostische Relevanz kontestiert (51, 61, 65, 67, 69, 71, 72, 75). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die prognostische Diskrepanz zwischen den IPI- Kategorien nicht ausreicht um, wie im Standard- IPI vorgesehen, vier distinkte Gruppen zu unterscheiden. Die Differenzen in den Überlebensraten nach r- IPI- Kategorien fielen hingegen deutlicher aus. Der IPI- Prognoseindex erwies sich somit retrospektiv in seiner revidierten Form auch unter Rituximab als einfach anwendbar und aussagekräftig. Die prognostische Stratifizierung nach Hans- Algorithmus produzierte keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen GCB und non- GCB Subtypen. Die Subgruppenanalyse für Hochrisikopatienten zeigte jedoch deutlich ungünstigere Verläufe für non-GCB Lymphome. Der Hans Algorithmus behielt in der Rituximab- Ära in unserer Auswertung nur in der Subgruppe der Hochrisiko Patienten seine Validität. Prognostische Unterteilungen haben insbesondere dann klinische Relevanz, wenn für eine Subgruppe ein vorteiliger Effekt durch eine von der Standardtherapie abweichende Therapieform beobachtet werden kann (132). Diese prädiktive Komponente könnte in der Identifizierung der Ursprungszelle zur Adaption von Therapiestrategien an Bedeutung gewinnen.

## Summary

The aim of this study was to evaluate the most frequently used prognostic tools for diffuse large B-cell lymphoma. The introduction of Rituximab-based immunotherapy has resulted in conflicting results regarding the relevance of the International Prognostic Index (IPI) and the Hans algorithm (57, 98) (51, 61, 65, 67, 69, 71, 72, 75). The latter is based on immunohistochemistry and used as a surrogate for GEP in determining cell of origin (66).

Before the introduction of Rituximab, it was possible to distinguish prognostic differences between GCB and non-GCB Lymphoma with the Hans algorithm. In our study, however, the algorithm was not able to detect differences in outcome. The exception to this was with high-risk patients: non-GCB lymphoma amongst high-risk patients were demonstrated to have a significantly inferior survival outcome.

The clinical tool IPI was shown to have retained its relevance even in the era of Rituximab therapy. In our retrospective analysis, the application of the r-IPI permitted the distinction of three discernibly different groups which varied in terms of clinical course of disease and survival rate. As opposed to these findings, the four prognostic groups as proposed by standard- IPI could not be significantly differentiated from one another.

In light of published results regarding cell-of origin- adapted approaches which guide therapy decisions, the predictive value, reliability and accessibility of prognostic algorithms such as the Hans algorithm will become increasingly important. Prognostic factors are of particular relevance when they guide clinical decision making (132). This predictive element may be of even greater interest in the attempt to further distinguish the large group of DLBCL NOS. Having reliable means to identify cell of origin will be a key factor in diagnostics once targeted therapies have been established for the DLBCL-subtypes.

## Literaturverzeichnis

- 1. Krebsregister Deutschland, Robert Koch Institut 2012 [Available from: <http://www.krebsdaten.de>.
- 2. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *British journal of cancer*. 2011;105:1684-92.
- 3. Chiu BC, Hou N. Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Res*. 2015;165:1-25.
- 4. Fisher GS, Fisher IR. The emerging concept of antigen-driven lymphomas: epidemiology and treatment implications. *Current opinion in oncology*. 2006;18:417-24.
- 5. Zelenetz A, Advani JSAR. Non-Hodgkin's lymphoma. 2015;165.
- 6. Blinder V, Fisher GS, Lymphoma Research Foundation NY. The role of environmental factors in the etiology of lymphoma. *Cancer investigation*. 2008;26:306-16.
- 7. Cerhan RJ, Kricker A, Paltiel O, Flowers RC, Wang SS, Monnereau A, et al. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monographs*. 2014;2014:15-25.
- 8. Glass S, Phan A, Williams NJ, Flowers RC, Koff LJ. Integrating understanding of epidemiology and genomics in B-cell non-Hodgkin lymphoma as a pathway to novel management strategies. *Discovery medicine*. 2016;21:181-8.
- 9. Korkolopoulou P, Vassilakopoulos T, Milionis V, Ioannou M. Recent Advances in Aggressive Large B-cell Lymphomas: A Comprehensive Review. *Adv Anat Pathol*. 2016;23(4):202-43.
- 10. Pileri SA, Dirnhofer S, Went P, Ascani S, Sabattini E, Marafioti T, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology*. 2002;41(6):482-509.
- 11. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007;27(2):190-202.
- 12. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1417-29.
- 13. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-7.
- 14. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 2015;52(2):67-76.

- 15. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
- 16. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9991-6.
- 17. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198(6):851-62.
- 18. Swerdlow SH CE, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
- 19. Gifford GK, Gill AJ, Stevenson WS. Molecular subtyping of diffuse large B-cell lymphoma: update on biology, diagnosis and emerging platforms for practising pathologists. *Pathology*. 2016;48(1):5-16.
- 20. Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood*. 1998;92(9):3410-5.
- 21. Magrath I. Molecular basis of lymphomagenesis. *Cancer Res*. 1992;52(19 Suppl):5529s-40s.
- 22. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*. 2002;99(7):2285-90.
- 23. Wang P, Lushnikova T, Odvody J, Greiner TC, Jones SN, Eischen CM. Elevated Mdm2 expression induces chromosomal instability and confers a survival and growth advantage to B cells. *Oncogene*. 2008;27(11):1590-8.
- 24. Bedekovics T, Hussain S, Feldman AL, Galardy PJ. UCH-L1 is induced in germinal center B cells and identifies patients with aggressive germinal center diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2016;127(12):1564-74.
- 25. Shaffer AL, 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:565-610.
- 26. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-80.
- 27. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
- 28. Haralambieva E, Adam P, Ventura R, Katzenberger T, Kalla J, Holler S, et al. Genetic rearrangement of FOXP1 is predominantly detected in a subset of diffuse large B-cell lymphomas with extranodal presentation. *Leukemia*. 2006;20(7):1300-3.
- 29. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13520-5.
- 30. Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2007;204(3):633-43.
- 31. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3360-5.

- 32. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114(17):3533-7.
- 33. Swerdlow HS, Campo E, Pileri AS, Harris LN, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375-90.
- 34. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-31.
- 35. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):90-9.
- 36. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-9.
- 37. Ruminy P, Etancelin P, Couronne L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, et al. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2011;25(4):681-8.
- 38. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV, et al. Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):728-40.
- 39. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula SV, Shen Q, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell*. 2005;7(5):445-55.
- 40. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(11):2332-43.
- 41. Chen J, Xu-Monette ZY, Deng L, Shen Q, Manyam GC, Martinez-Lopez A, et al. Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6(8):5597-614.
- 42. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23.
- 43. Meyer PN, Fu K, Greiner T, Smith L, Delabie J, Gascoyne R, et al. The stromal cell marker SPARC predicts for survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(1):54-61.
- 44. Cardesa-Salzmann TM, Colomo L, Gutierrez G, Chan WC, Weisenburger D, Climent F, et al. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica*. 2011;96(7):996-1001.
- 45. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22-32.
- 46. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet*. 1988;1(8580):292-3.
- 47. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.



- 48. Campo E, Swerdlow HS, Harris LN, Pileri S, Stein H, Jaffe SE. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117:5019-32.
- 49. Klapper W. Diffuse large B-cell lymphoma: how much do we need to know at diagnosis? 2015;9.
- 50. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971;31(11):1860-1.
- 51. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010;116(23):4916-25.
- 52. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2373-80.
- 53. Shipp A. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-94.
- 54. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-61.
- 55. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-42.
- 56. Cultrera JL, Dalia SM. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. *Cancer Control*. 2012;19(3):204-13.
- 57. Advani RH, Chen H, Habermann TM, Morrison VA, Weller EA, Fisher RI, et al. Comparison of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494, CALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI). *Br J Haematol*. 2010;151(2):143-51.
- 58. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-47.
- 59. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(24):6686-95.
- 60. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494-502.
- 61. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-7.
- 62. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves

risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.* 2006;208(5):714-23.

- 63. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol.* 2008;26(3):447-54.
- 64. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppa S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1094-101.
- 65. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia.* 2012;26(9):2103-13.
- 66. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004;103(1):275-82.
- 67. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunotherapy. *Blood.* 2011;117(18):4836-43.
- 68. Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J, et al. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood.* 2005;106(10):3383-5.
- 69. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Cuccini W, Hirschaud E, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol.* 2011;29(31):4079-87.
- 70. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzypuc T, Vesole DH, Logan B, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(4):464-70.
- 71. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4587-94.
- 72. Castillo JJ, Beltran BE, Song MK, Ilic I, Leppa S, Nurmi H, et al. The Hans algorithm is not prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Leuk Res.* 2012;36(4):413-7.
- 73. Ott MM, Horn H, Kaufmann M, Ott G. The Hans classifier does not predict outcome in diffuse large B cell lymphoma in a large multicenter retrospective analysis of R-CHOP treated patients. *Leuk Res.* 2012;36(5):544-5.
- 74. Salles G, de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood.* 2011;117(26):7070-8.
- 75. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in

patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 2013;381(9880):1817-26.

- 76. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):805-12.
- 77. Lawrie CH, Ballabio E, Soilleux E, Sington J, Hatton CS, Dirnhofer S, et al. Inter- and intra-observational variability in immunohistochemistry: a multicentre analysis of diffuse large B-cell lymphoma staining. *Histopathology*. 2012;61(1):18-25.
- 78. Rovira J, Valera A, Colomo L, Setoain X, Rodriguez S, Martinez-Trillos A, et al. Prognosis of patients with diffuse large B cell lymphoma not reaching complete response or relapsing after frontline chemotherapy or immunochemotherapy. *Ann Hematol*. 2015;94(5):803-12.
- 79. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2780-95.
- 80. Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol*. 2005;23(12):2797-804.
- 81. El-Galaly TC, Villa D, Alzahrani M, Hansen JW, Sehn LH, Wilson D, et al. Outcome prediction by extranodal involvement, IPI, R-IPI, and NCCN-IPI in the PET/CT and rituximab era: A Danish-Canadian study of 443 patients with diffuse-large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2015;90(11):1041-6.
- 82. Tomita N, Yokoyama M, Yamamoto W, Watanabe R, Shimazu Y, Masaki Y, et al. Central nervous system event in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci*. 2012;103(2):245-51.
- 83. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;328(14):1002-6.
- 84. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5027-33.
- 85. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116(12):2040-5.
- 86. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-42.
- 87. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Ferme C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4117-26.
- 88. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3121-7.
- 89. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trnety M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in

- young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):379-91.
- 90. Armitage JO. How I treat patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007;110(1):29-36.
  - 91. Caimi PF, Hill BT, Hsi ED, Smith MR. Clinical approach to diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev.* 2016.
  - 92. Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). In: Evens MA, Blum AK, editors. *Non-Hodgkin Lymphoma: Pathology, Imaging, and Current Therapy.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 271-88.
  - 93. Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2015:e449-57.
  - 94. Sehn LH. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:402-9.
  - 95. Tadmor T, Shvidel L, Bairey O, Goldschmidt N, Ruchlemer R, Fineman R, et al. Richter's transformation to diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study reporting clinical data, outcome, and the benefit of adding rituximab to chemotherapy, from the Israeli CLL Study Group. *Am J Hematol.* 2014;89(11):E218-22.
  - 96. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649-55.
  - 97. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1113-20.
  - 98. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, Marcheselli R, Pozzi S, Ferri P, et al. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story. *Ann Oncol.* 2010;21(7):1486-91.
  - 99. Hedstrom G, Hagberg O, Jerkeman M, Enblad G, Swedish Lymphoma Study G. The impact of age on survival of diffuse large B-cell lymphoma - a population-based study. *Acta Oncol.* 2015;54(6):916-23.
  - 100. Park JH, Yoon DH, Kim DY, Kim S, Seo S, Jeong Y, et al. The highest prognostic impact of LDH among International Prognostic Indices (IPIs): an explorative study of five IPI factors among patients with DLBCL in the era of rituximab. *Ann Hematol.* 2014;93(10):1755-64.
  - 101. Yang S, Yu Y, Jun-Min L, Jian-Qing M, Qiu-Sheng C, Yu C, et al. Reassessment of the prognostic factors of international prognostic index (IPI) in the patients with diffuse large B-cell lymphoma in an era of R-CHOP in Chinese population. *Ann Hematol.* 2009;88(9):863-9.
  - 102. Mareschal S, Lanic H, Ruminy P, Bastard C, Tilly H, Jardin F. The proportion of activated B-cell like subtype among de novo diffuse large B-cell lymphoma increases with age. *Haematologica.* 2011;96(12):1888-90.
  - 103. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need? *Mod Pathol.* 2013;26 Suppl 1:S42-56.
  - 104. Dores GM, Anderson WF, Devesa SS. Cutaneous lymphomas reported to the National Cancer Institute's surveillance, epidemiology, and end results program:

applying the new WHO-European Organisation for Research and Treatment of Cancer classification system. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7246-8.

- 105. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2013;14(6):525-33.
- 106. Recher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Ferme C, Casasnovas O, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2011;378(9806):1858-67.
- 107. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* 2008;9(2):105-16.
- 108. Miller TP, Spier CM, Rimsza L. Diffuse aggressive histologies of non-hodgkin lymphoma: treatment and biology of limited disease. *Semin Hematol.* 2006;43(4):207-12.
- 109. Sehn LH. Chemotherapy alone for localized diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer J.* 2012;18(5):421-6.
- 110. Vose JM. Intensified chemotherapy for diffuse large B-cell lymphomas. *Lancet.* 2011;378(9806):1828-9.
- 111. Gang AO, Strom C, Pedersen M, d'Amore F, Pedersen LM, Bukh A, et al. R-CHOEP-14 improves overall survival in young high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma compared with R-CHOP-14. A population-based investigation from the Danish Lymphoma Group. *Ann Oncol.* 2012;23(1):147-53.
- 112. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Schmidt C, et al. Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol.* 2012;13(12):1250-9.
- 113. Greb A, Bohlius J, Trelle S, Schiefer D, De Souza CA, Gisselbrecht C, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell support in first-line treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma - results of a comprehensive meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(4):338-46.
- 114. Stiff PJ, Unger JM, Cook JR, Constine LS, Couban S, Stewart DA, et al. Autologous transplantation as consolidation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2013;369(18):1681-90.
- 115. Walter E, Schmitt T, Dietrich S, Ho A, Witzens-Harig M. Rituximab and bendamustine in patients with CD20+ diffuse large B-cell lymphoma not eligible for cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone-like chemotherapy. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(11):2290-2.
- 116. Weidmann E, Neumann A, Fauth F, Atmaca A, Al-Batran SE, Pauligk C, et al. Phase II study of bendamustine in combination with rituximab as first-line treatment in patients 80 years or older with aggressive B-cell lymphomas. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1839-44.
- 117. Ohmachi K, Niitsu N, Uchida T, Kim SJ, Ando K, Takahashi N, et al. Multicenter phase II study of bendamustine plus rituximab in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2013;31(17):2103-9.

- 118. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1995;333(23):1540-5.
- 119. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90.
- 120. Armitage JO. Staging non-Hodgkin lymphoma. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(6):368-76.
- 121. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*. 1989;7(11):1630-6.
- 122. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, et al. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. *Lancet Oncol*. 2008;9(5):435-44.
- 123. Olszewski AJ, Mantripragada KC, Castillo JJ. Risk Factors for Early Death After Rituximab-Based Immunochemotherapy in Older Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(9):1121-9.
- 124. Olszewski AJ, Winer ES, Castillo JJ. Validation of clinical prognostic indices for diffuse large B-cell lymphoma in the National Cancer Data Base. *Cancer Causes Control*. 2015;26(8):1163-72.
- 125. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007;110(4):1278-82.
- 126. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1452-7.
- 127. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*. 2006;107(11):4207-13.
- 128. Reber R, Banz Y, Garamvolgyi E, Perren A, Novak U. Determination of the molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphomas using immunohistochemistry: a case series from the Inselspital, Bern, and a critical appraisal of this determination in Switzerland. *Swiss Med Wkly*. 2013;143:w13748.
- 129. Camilleri-Broet S, Criniere E, Broet P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*. 2006;107(1):190-6.
- 130. Lin CH, Kuo KT, Chuang SS, Kuo SH, Chang JH, Chang KC, et al. Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin. *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1152-6.
- 131. Maurer MJ, Ghesquieres H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1066-73.

- 132. Loeffler M, Shipp M, Stein H. 2. Report on the workshop: "Clinical consequences of pathology and prognostic factors in aggressive NHL". *Ann Hematol.* 2001;80 Suppl 3:B8-12.

**Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## **Danksagung**

Meine größte Anerkennung gebührt Prof. M. Rummel für die Weitsicht mit der Sie diese Arbeit begleitet haben. Die Motivation und Hingabe die Sie der Ergründung der non-Hodgkin Lymphome entgegenbringen, waren geradezu ansteckend und weckten auch meine Begeisterung. Ihre nüchterne Analyse lehrte mich, dass der Wissensstand auf dem Gebiet der Lymphome einem stetigen Wandel unterworfen ist.

Ich bedanke mich an dieser Stelle für das Vertrauen, das mir entgegen gebracht wurde sowie für konstruktive Hilfestellungen.

Weiterhin möchte ich meinen Dank an das Institut für Pathologie unter Leitung Prof. Gattenlöhners richten. Die nachträgliche immunhistochemische Auswertung ermöglichte den Einschluss zahlreicher zusätzlicher Patienten, die der Analyse andernfalls nicht zugänglich gewesen wären.

Ferner soll die Unterstützung durch die Mitarbeit der Stil- Studienzentrale hervorgehoben werden. Hier danke ich insbesondere Dr. Kauff für die Unterstützung in der software-basierten Auswertung der Überlebensdaten.

Letztlich danke ich meiner Familie und Claire Manning, die mich zur Verfolgung dieses Projekts ermutigten.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6737-3



9 783835 196737